Aus der II. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. I. Boll

Die Wirkung von autologem- und CML-Serum auf Knochenmark von Anämie-Patienten in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Silke Wegeleben
Berlin

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0013

Aus der II. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. I. Boll

Die Wirkung von autologem- und CML-Serum auf Knochenmark von Anämie-Patienten in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Silke Wegeleben
Berlin

Referent: Professor Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. W. Siegert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 19. August 1985

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Fragestellung	7
3.	Material und Methode	8
3.1.	Material	8
3.2.	Methode	15
4.	Ergebnisse	20
4.1.	Versuch 1	20
4.2.	Versuch 2	29
4.3.	Versuch 3	37
4.4.	Versuch 4	46
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
5.1.	Erythropoese	51
5.2.	Granulopoese	52
5.3.	Myeloblasten	53
6.	Diskussion	62
7.	Zusammenfassung	68
8.	Literaturverzeichnis	69

1. EINLEITUNG

Im normalen Knochenmark ist dem Proerythroblasten, der frühesten morphologisch identifizierbaren Zelle des erythropoetischen Systems, das Kompartiment der determinierten Stammzelle, der ERC (erythropoietin responsive cells), vorgeschaltet (66). Indirekt ließ sich diese Zellgruppe an polyglobulen Mäusen, deren Erythropoese völlig unterdrückt war, durch Messung der Erythroblastenvermehrung nach Erythropoetinverabreichung nachweisen(29). Mit der Plasma-Clot- und der Methylcellulose-Technik gelang unter Einfluß von Erythropoetin die quantitative Erfassung von Erythroblastenkolonien,die sich von determinierten Stammzellen herleiten (39). Es konnten zwei koloniebildende Zellarten festgestellt werden, die zwar nicht morphologisch, jedoch durch ihr Wachstumsverhalten in der Kultur und einige physikalische Eigenschaften gekennzeichnet sind. Dazu gehört die unterschiedliche Erythropoetinsensibilität (40):

Eine Zellart (BFU_e = burst forming units of erythroblasts) benötigt anfänglich (bis zu 4 Tagen) kein Erythropoetin, für weiteres Wachstum allerdings höhere Mengen und bildet große Kolonien.Sie ist in der Lage unter Einfluß von BPA (burst promoting activity) unabhängig von Erythropoetin zu proliferieren (40,41). BPA, enthalten u.a. in Pferde- und fetalem Schafsserum, ist erforderlich für das Wachstum von Kolonien der erythropoetischen Reihe (BFU_e), der myeloischen Reihe (CFU_c) und evtl. der lymphoiden Zellreihe aus undeterminierten Stammzellen (CFU_s). Es zeigt eine ähnliche Wirkung wie CSA (colony stimulating activity) bei der Produktion von Granulozyten / Makrophagen -Kolonien, wobei von BPA die eher frühen Zellformen stimuliert werden. Bei weiterer Differenzierung der Zellen sinkt die Empfindlichkeit gegenüber BPA und es steigt die Sensibilität gegenüber Erythropoetin in der roten Reihe und CSA in der weißen Reihe (41). In ähnlicher Weise fand AYE (3) die Koloniebildung von humanen BFU_e abhängig von der Zugabe von Leukozyten conditioned medium (LCM), gewonnen aus Kulturen

peripherer Blutzellen von gesunden Personen und embryonalen menschlichen Nieren. Bestimmte Zellpopulationen, die durch Säulenchromatographie separiert wurden, zeigten eine vermehrte Koloniebildung unter Zugabe von Erythropoetin, wobei sich eine weitere Steigerung durch Zusatz von Leukozyten conditioned medium (LCM) erreichen ließ. Knochenmarkzellen von Patienten mit Polyzythämia vera bildeten ohne Erythropoetinzugabe in LCM vermehrt Erythroblastenkolonien. Biochemisch weist die auf BFU_e wirkende Fraktion von Leukozyten conditioned medium Ähnlichkeiten zu CSA auf. Dies beweist, daß die Koloniebildung erythropoetischer Vorläuferzellen nicht allein von der Erythropoetinkonzentration, sondern auch von der Anwesenheit von LCM in den Kulturen bestimmt wird (72). Leukozyten conditioned medium (bzw. CSA) enthält demnach Faktoren, die nicht allein die Granulopoese, sondern auch die Erythropoese stimulieren.

Die andere Zellart der erythropoetischen Vorläufer (CFU_e) bildet eher kleinere Kolonien, ist Erythropoetin sensibel und besteht aus sehr stark proliferierenden Zellen (40,41). Die Ergebnisse von TESTA et al. (68) aus Langzeitkulturversuchen mit Mäuseknochenmark machen deutlich, daß die BFU_e relativ frühe Formen der Erythropoese sind und ihre Differenzierung aus der Stammzelle Erythropoetin unabhängig abläuft. CFU_e sind reifere Formen, in deren Entwicklung die Erythropoetinsensibilität zunimmt.

GREGORY et al. (28) konnten in Methylcellulose-Kulturen von Mäuseknochenmark einen weiteren Typ von BFU_e bestimmen, dessen Erythropoetinsensibilität zwischen der der CFU_e und der vorher sichtbaren BFU_e lag. Damit ist für die Maus bewiesen, daß die fortschreitende Differenzierung der Erythroblastenvorläufer mit einer zunehmenden Erythropoetinsensibilität verbunden ist (47).

An der Regulation der Kompartimente der determinierten Stammzellen sind mehrere Faktoren beteiligt: Tierexperimentell wurde gezeigt, daß nach maximaler Stimulation der Erythropoese durch Erzeugung einer schweren hämolytischen Anämie im Kompartiment der undeterminierten Stammzelle (CFU_s = colony forming units in spleen) zuerst eine Zell-

verminderung auftritt, die dann von einer Phase der Proliferation abgelöst wird (58). Dadurch werden mehr Stammzellen für die Erythropoese zur Verfügung gestellt. Als Folge der durch Hypoxie ausgelösten Vermehrung der erythropoetisch determinierten Stammzellen kommt es neben der Verminderung der undeterminierten Stammzellen (CFU_s) zu einer Verminderung der myeloisch determinierten Stammzellen (CFU_c = colony forming units in culture) (18,60).

Das Erythropoetin, der wichtigste Regulationsfaktor der Erythrozytenproduktion, greift an den Zellen des determinierten Stammzellkompartiments (CFU_e und BFU_e) und nicht an der pluripotenten Stammzelle (CFU_s) an (19,44). SCHOOLEY et al. (63) injizierten normalen Mäusen Anti-Erythropoetin-Immunserum und fanden ein Verschwinden der Erythropoese, während die Granulo- und Megakaryopoese nur wenig beeinflußt wurde. Erythropoetin fördert die Proliferation der ERC (erythropoietin responsive cells), was mit Hilfe von Eiseninkorporationsmessungen an Mäusen gezeigt wurde (57), und erhöht damit die Zahl der erythropoetisch determinierten Stammzellen, die dann auf Erythropoetin vermehrt ansprechen (37). STLVES et al. (64) schlossen aus den Ergebnissen ihrer Versuche mit anämischem Knochenmark von Kaninchen, daß zugesetztes Erythropoetin darüberhinaus die Transformation von determinierten Stammzellen, die als solche morphologisch nicht identifizierbar sind, in Proerythroblasten fördere (64,22). Durch Versuche mit Hydroxyurea, einem Zellgift, das selektiv auf Zellen in der DNA-Synthesephase wirkt, ließ sich zeigen, daß die determinierten erythropoetischen Stammzellen (BFU_e und CFU_e) nach Erythropoetingabe eine verkürzte G_1 -Phase durchlaufen und damit eine Verkürzung der Generationszeit eintritt (50).

Eine ähnlich fördernde Wirkung zeigt Erythropoetin auf die Zellen des proliferativen Erythroblasten-Kompartiments. Mit autoradiographischen Messungen bei anämischen Ratten wurden verkürzte Zellzykluszeiten für Proerythroblasten, basophile und polychromatische Erythroblasten festgestellt, wobei vor allem die S- und G_1 - Phase betroffen waren (32). PAPAYANNOPOULOU et al. (53) fanden ähnliches bei polyzythämischen Mäusen, deren Erythropoese in Knochenmark und Milz

unterdrückt war,nach wiederholter Gabe von exogenem Erythropoetin. Eine weitere Wirkung von Erythropoetin auf die Zellen des erythropoetischen Systems bestent in der Beschleunigung der Hämsysthese. NECHELES et al. (52) fanden bei der Messung der Hb-, Non-Hämoglobin-Protein-und DNA-Synthese in Zellsuspensionskulturen menschlichen Knochenmarks nach Zugabe von humanem Erythropoetin alle Parameter erhöht. Ähnliches fanden POWSNER et al. (55) und KRANTZ et al. (43). Unter diesen Bedingungen werden bei Ratten außerdem Retikulozyten beschleunigt freigesetzt und Makrozyten gebildet (65). Dies führte zu der Annahme, daß die Erythroblasten bei beschleunigtem Erreichen der kritischen Hb-Konzentration die letzte Teilung auslassen können (skipped terminal division) und vorzeitig ins Reifungskompartiment eintreten (66,46). Auch bei stimulierter menschlicher Erythropoese ließ sich mit ^{3}H-Thymidin-Markierung eine reduzierte Zahl von Zellgenerationen feststellen (20). Demgegenüber steht die Beobachtung, daß bei normaler Erythropoese nur etwa ein Achtel der polychromatischen Erythroblasten teilungsfähig ist, während die übrigen wie fast alle oxyphilen Erythroblasten nur noch reifen, man somit von übersprungenen Zellteilungen unter normalen Bedingungen ausgehen muß. Bei angeregter Erythropoese ist ein weit größerer Anteil der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten teilungsfähig (8,16).

Für das Auftreten von Anämien sind unterschiedliche Faktoren verantwortlich. Beim Zustandekommen megaloblastärer Anämien infolge Vit.B_{12} - oder Folsäuremangels werden verschiedene pathologische Mechanismen diskutiert: WICKRAMASINGHE et al. (74) kombinierten die ^{3}H-Thymidin-Autoradiographie mit der zytophotometrischen Messung des DNA-Gehalts von Knochenmarkzellen und fanden zum einen eine erhöhte Zahl von Erythroblasten, die sich in der G_2-Phase befanden. Außerdem besaßen mehrere Zellen einen DNA-Gehalt zwischen 2c und 4c, befanden sich also in der S-Phase. Sie führten aber keine DNA-Synthese durch. Als Erklärung nehmen sie eine Arretierung der Zellen, besonders der polychromatischen Erythro- und Megaloblasten in der S-Phase nach einer Initialperiode der DNA-Synthese an. RONDANELLI et al. (61) fanden bei Phasenkontrastbeobachtungen

die Mitosedauer von Megaloblasten gegenüber Normoblasten verkürzt und errechneten zusammen mit dem erhöhten Mitose-Index eine verkürzte Generationszeit, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Koagulumkultur- und in-vitro-Beobachtungen von BOLL et al. (6,8,13,16). Ein weiterer pathogenetischer Faktor ist die Ineffektivität der megaloblastären Erythropoese. FINCH et al. (25) fanden an ferrokinetischen Untersuchungen, daß bei erheblich gesteigerter Erythropoese Eisen in die megaloblastären Zellen bei der Hämoglobinisierung eingebaut wird. Diese reifen jedoch zum großen Teil nicht aus, sondern sterben intramedullär ab. Grundsätzlich ähnliche Vorgänge wie Kernreifungsstörung und erhöhtes intramedulläres Absterben kommen bei perniziöser Anämie auch in der granulopoetischen Reihe vor (6,36).

Bei Untersuchungen am Knochenmark von Patienten mit sideroachrestischer Anämie wurden ebenfalls eine Arretierung von Erythroblasten in der DNA-Synthesephase und meist auch in der G_2-Phase wahrscheinlich gemacht (38). Dies wurde besonders an Erythroblasten mit starker Hämosiderinablagerung beobachtet, so daß die Annahme besteht, die Ringsideroblasten würden bereits vermehrt intramedullär absterben und damit die Ineffektivität der Erythropoese verursachen.

Bei Fe-Mangel-Anämie bestehen Defekte mehrerer biochemischer Funktionen: HERSHKO et al. (34) berichteten von reduzierter Häm-, Protein- und DNA-Synthese humaner Knochenmarkzellen von Patienten mit Fe-Mangel-Anämie. Aufgrund des Eisen-Mangels ist die Hämoglobinisierung behindert, die kritische Hb-Konzentration/Erythroblast wird verzögert erreicht und es kommt zu zusätzlichen Zellteilungen, wobei dann kleinere Erythrozyten (Mikrozyten) entstehen (66,16). Der teilungsfähige Anteil der Erythropoese umfaßt dadurch 80% der Erythroblasten, wodurch vermehrt polychromatische und oxyphile Erythroblasten Mitosen aufweisen (7,8). Außerdem ist die Entkernung der Erythroblasten behindert im Sinne einer Verzögerung der Ausreifung (13). Eine deutliche Abhängigkeit der Proliferationsleistung des Knochenmarks vom Serumeisenspiegel konnte an Freiwilligen mit durch Phlebotomie induzierten Anämien nachgewiesen werden (35).

Bei den hämolytischen Anämien löst der gesteigerte Erythrozytenabbau in der Peripherie mehrere kompensatorische Mechanismen aus: Zum einen die Stimulation der Erythroblasten im Knochenmark, vermittelt durch die Mehrproduktion an Erythropoetin (31). Dies greift vorzugsweise an den hämopoetischen Stammzellen (CFU_e und BFU_e) an und bewirkt über die Induktion der Hb-Synthese eine Steigerung der Produktionsrate von Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten (26). Außerdem ist eine Verkürzung der Zellzyklus - zeiten teilungsfähiger Erythroblasten mit verkürzter Transitzeit durch die verschiedenen Reifungskompartimente ebenso wahrscheinlich wie eine herabgesetzte Hb-Synthese (51). Autoradiographische Messungen an Erythroblasten bei akuter Hämolyse (erworbene hämolytische Anämien) ergaben, daß die letzte der drei Teilungsstufen partiell ausgelassen (skipped terminal division), dagegen bei chronischer Hämolyse (kongenitale Sphärozytose im Gleichgewicht) z.T. eine vierte Teilungsstufe durchgemacht wird (21).

2. FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich die Proliferation der Erythro- und Granulopoese in Knochenmark-Kulturen von Patienten mit verschiedenen Anämien bei Zugabe von frischem autologem oder gefrorenem und getautem CML-Serum verändert.
Anämie-Serum weist einen erhöhten Erythropoetin-Spiegel auf, dessen Einfluß mit gefrorenem und getautem AB-Plasma, als neutralem Medium verglichen wird.
Das Serum von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie besitzt eine hohe Colony Stimulating Activity (CSA) (14). Durch Einfrieren der CML-Seren und Verwendung in getautem Zustand werden die enthaltenen Chalone zerstört (14). Die stimulierende Wirkung auf granulopoetische Zellen (14), wie auf erythropoetische Zellen, im Sinne von BPA (Burst Promoting Activity) (41), wird ausgewertet.
Weiterhin wird die Proliferationskinetik der Myeloblasten unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen des Erythropoetins im Anämie-Serum bzw. der CSA im CML-Serum untersucht.
Die Wirkung der Seren wird an 6 Stichtagen über 11 Tage beobachtet und den Ergebnissen der Kulturen mit AB-Plasma gegenüber gestellt.
Als Parameter der Proliferation dienen Reifungskurven, Mitose- und G/E-Indices, deren Veränderungen durch Signifikanzberechnung statistisch gesichert werden.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Material

Das für die Versuche benötigte Knochenmark wurde durch Sternalpunktion von 4 Patienten gewonnen.
Die Daten der Knochenmark- und Serumspender werden im folgenden zusammengestellt:

Knochenmark - Spender für Versuch 1

Patient: E.Trö., 56 Jahre

Diagnose: Sideroblastische Anämie

Sternalpunktion vom 16.8.1982: Vermehrung der Erythropoese bei reichlicher Fe-Speicherung, keine Megaloblastoide, zahlreiche Sideroblasten und Siderozyten, Ringsideroblasten vorhanden

Blutbild vom 16.8.1982:

Hb	12,5	g%
Hb_E	34,8	pg
Hkt	34,7	%
Erythrozyten	3,61	Mill/µl
Leukozyten	2600	/µl
Segmentkernige	50	%
Lymphozyten	36	%
Monozyten	9	%
Eosinophile	4	%
Basophile	1	%
FEBK	24,8	µmol/l
Eisen im Serum	17,5	µmol/l

Knochenmark - Spender für Versuch 2

Patient:	H.Lat., 42 Jahre
Diagnose:	Eisenmangel - Anämie
Sternalpunktion vom 15.3.1982:	stark linksverschobene Erythropoese, Megaloblastoide kommen reichlich vor, fehlende Fe-Speicherung im Reticulum, keine Sideroblasten und Siderozyten, Granulopoese vermehrt und linksverschoben

Blutbild vom 15.3.1982:

Hb	9,1 g%
Hb_E	21,6 pg
Hkt	30,9 %
MCV	74 μm^3
Erythrozyten	4,16 Mill/µl
Leukozyten	7500 /µl
Thrombozyten	296000 /µl
Segmentkernige	67 %
Stabkernige	1 %
Lymphozyten	25 %
Monozyten	4 %
Eosinophile	2 %
Basophile	1 %
EBK	5,1 µmol/l
Eisen im Serum	78,9 µmol/l

Medikation: Ce-Ferro forte® 2 x 1 Kps./d

Knochenmark - Spender für Versuch 3

Patient: K.Fi., 63 Jahre

Diagnose: Perniziöse Anämie

Sternalpunktion vom 11.10.1982: stark vermehrte Erythropoese, Megaloblasten zu 80 % mit Kernatypien, Hämozytoblasten reichlich vorhanden, kaum Fe-Speicherung im Reticulum, keine Sideroblasten, Ringsideroblasten und Siderozyten, Granulopoese wenig vermindert, Riesenstäbe vorhanden, Megakaryozyten reichlich und hypersegmentiert

Blutbild vom 8.10.1982:

Hb	7,4 g%
Hb_E	40,2 pg
Hkt	19,8 %
MCV	108,0 μm^3
Erythrozyten	1,84 Mill/µl
Leukozyten	3200 /µl
Thrombozyten	134000 /µl
Segmentkernige	69 %
Lymphozyten	27 %
Monozyten	3 %
Promyelozyten	1 %
Retikulozyten	57000 /µl
EBK	34,3 µmol/l
Eisen im Serum	43,5 µmol/l

Knochenmark - Spender für Versuch 4

Patient:	M.Zü., 46 Jahre
Diagnose:	Hämolytische Anämie, Leukopenie
Sternalpunktion vom 28.2.1983:	wenig vermehrte linksverschobene Erythropoese, Megaloblastoide zu 8 % vorhanden, Erythroblasten-Mitosen stark vermehrt, Fe-Speicherung vorhanden, wenig Sideroblasten, reichlich Siderozyten, Granulopoese wenig vermehrt, Thrombopoese unauffällig
Blutbild vom 28.2.1983:	Hb 10,7 g% Hb_E 37,5 pg Hkt 29,8 % MCV 105,0 μm^3 Erythrozyten 2,86 Mill/µl Leukozyten 1800 /µl Thrombo- u. Leukozyten 138000 /µl Stabkernige 4 % Segmentkernige 47 % Lymphozyten 42 % Monozyten 2 % Eosinophile 4 % Basophile 1 % Retikulozyten 121000 /µl
14.3.1983:	LDH 126 U/l Fe 13,2 µmol/l EBK 50,7 µmol/l Coombstest, direkt negativ

CML - Serum - Spender für Versuch 1 und 4

Patient: H.Wa., 50 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie seit 1981

Blutbild vom 9.2.1982:

Hb	14,1 g%
Hb_E	28,3 pg
Hkt	42,9 %
Erythrozyten	4,97 Mill/µl
Leukozyten	6700 /µl
Thrombozyten	166000 /µl

Medikation: 3 x 2 mg/Wo. Myleran

Blutentnahme zur Serumherstellung für Versuch 1 am 11.2.1982.

Blutbild vom 1.2.1983:

Hb	10,9 g%
Hb_E	28,7 pg
Hkt	31,3 %
Erythrozyten	3,8 Mill/µl
Leukozyten	16200 /µl
Thrombozyten	195000 /µl
Segmentkernige	61 %
Stabkernige	6 %
Promyelozyten	3 %
Myelozyten	6 %
Metamyelozyten	7 %
Basophile	1 %
Eosinophile	2 %
Lymphozyten	14 %

Medikation: 1 x 2 mg/Wo. Myleran

Blutentnahme zur Serumherstellung für Versuch 4 am 1.2.1983.

CML - Serum - Spender für Versuch 2

Patient: W.Fo., 74 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie seit 1975

Blutbild vom 15.2.1982:

Hb	14,1 g%	
Hb_E	27,6 pg	
Hkt	44,0 %	
Erythrozyten		5,1 Mill/µl
Leukozyten		73000 /µl
Thrombozyten		190000 /µl
Basophile		4 %
Eosinophile		1 %
Myeloblasten		1 %
Promyelozyten		1 %
Myelozyten		9 %
Metamyelozyten		4 %
Stabkernige		14 %
Segmentkernige		55 %
Lymphozyten		8 %
Monozyten		3 %

Medikation: 5 x 2 mg/Wo. Myleran

Blutentnahme zur Serumherstellung für Versuch 2 am 15.2.1982.

CML - Serum - Spender für Versuch 3

Patient: E.Me., 50 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie seit 1976

Sternalpunktion vom 29.10.1982: kein Anhalt für Blastenschub

Blutbild vom 24.8.1982:

Hb	10,7 g%
Hb_E	25,7 pg
Hkt	37,4 %
Erythrozyten	4,16 Mill/µl
Leukozyten	25800 /µl
Stabkernige	8 %
Segmentkernige	54 %
Promyelozyten	3 %
Myelozyten	3 %
Metamyelozyten	5 %
Basophile	5 %
Blasten	8 %
Lymphozyten	7 %
Monozyten	7 %

Blutentnahme zur Serumherstellung für Versuch 3 am 24.8.1982.

AB - Plasma für die Versuche 1 - 4

Das verwendete AB-Plasma stammt von hämatologisch nicht erkrankten Probanden des Berliner Blutspendedienstes und wurde gefroren aufbewahrt.

3.2. Methode

Kulturansatz (Suspensionskultur)

Nach der von Boll 1975 entwickelten Methode (12) wurden die in heparinhaltiger (5-10 E/ml) Hanks-Lösung (Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232, USA) aspirierten Markbröckchen in RPMI-Medium 1640 (Gibco-Bio-Cult, 3 Washington Road, Paisley PA 3 4EP, Scotland) gebracht und mit Hilfe mehrmaliger Passagen durch Kanülen abnehmenden Kalibers homogenisiert. Die Suspension wird zentrifugiert und der fetthaltige Überstand verworfen.
Danach erfolgen die Kulturansätze:

Versuche 1 - 3
Kontrollansatz: 100 % AB-Plasma

1. 1,8 ml Zellsuspension mit 100 % AB-Plasma aufgeschwemmt (verdünnt auf ca. 2.000 Zellen/ml)
2. auf 1 ml Zellsuspension 11,6 µg Ampicillin
3. auf 1 ml Zellsuspension 2,4 µg Streptomycin

Versuchsansätze: a) 100 % Eigen-Serum / b) 100 % CML-Serum

1. 1,8 ml Zellsuspension mit 100 % Eigen - bzw. CML - Serum aufgeschwemmt (verdünnt auf ca. 2.000 Zellen/ml)
2. und 3. wie oben

Versuch 4
Kontrollansatz: 40 % AB-Plasma

1. 1,8 ml Zellsuspension mit 40 % AB-Plasma und 60 % RPMI- Medium 1640 aufgeschwemmt
2. und 3. wie oben

Versuchsansatz: 40 % CML- Serum

1. 1,8 ml Zellsuspension mit 40 % CML - Serum und 60 % RPMI- Medium 1640 aufgeschwemmt
2. und 3. wie oben

Die CML-Seren wurden sofort nach ihrer Gewinnung tiefgefroren und getaut für die Versuche verwendet.
Die drei Kulturansätze für die Versuche 1-3 und die zwei Ansätze für den Versuch 4 wurden für jede Stichprobe getrennt in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Gefäße wurden luftdicht verschlossen; über der Flüssigkeit befand sich eine relativ große Gasphase.
Nach der Inkubation bei 37°C wurden nach 2, 4, 7, 9 und 11 Tagen jeweils drei Ausstriche mit Hilfe der Zytozentrifuge (500 U/min = 22 g, über 5 Minuten) angefertigt, um möglichst 2.000 Zellen pro Kultur definitiv identifizieren zu können. Nach der Pappenheim-Färbung erfolgt die Differenzierung der Zellen mäanderförmig.
Die 0-Tage Kontrollpräparate, die Ausgangswerte der Kultur, wurden vor der Inkubation mit der Zytozentrifuge angefertigt.

Auswertung

Die Differenzierung in retikuläre, erythropoetische, granulopoetische und thrombopoetische Zellen sowie die dazugehörigen Mitosen erfolgte nach den Kriterien von BOLL (8, 9, 15), BEGEMANN (4), HECKNER (33), Mc DONALD (49) und UNDRITZ (70).

Mit fortschreitender Bebrütungsdauer nimmt die Empfindlichkeit der Zellen zu, so daß häufig ab 7.Tag ein großer Zellanteil in den Kulturen zerstört und nur schwer zu differenzieren war.

Folgende Parameter der Proliferationskinetik wurden bestimmt:

1. Reifungskurven

   Additiv aufgetragene Differentialverteilungen der Zellen der roten und weißen Reihe (in %) in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

2. Mitose - Indices

Das Verhältnis der Mitosen zu den teilungsfähigen Zellen angegeben in Promille. Es werden Angaben zu den einzelnen Versuchen getrennt für die Erythropoese (rMI) und für die Granulopoese (wMI) gemacht. Darüberhinaus wurden mittlere Mitose-Indices für rote und weiße Reihe berechnet, indem die in allen vier Versuchen an einem Stichtag beobachteten Mitosen zu den jeweils teilungsfähigen Zellen ins Verhältnis gesetzt wurden, getrennt nach Versuchsansatz. Der Gesamt - Myeloblasten - Mitose - Index ergibt sich aus den auftretenden Mitosen in allen Kulturen zu den differenzierten Myeloblasten , getrennt nach Serumzusatz.
In der Erythropoese gelten außer den reifen Erythroblasten alle Zellen als teilungsfähig, in der Granulopoese die Zellen vom Myeloblasten bis zum Metamyelozyten und Promonozyten (15).

3. G/E - Index

Zahlenmäßiges Verhältnis aller Zellen der Granulopoese zu denen der Erythropoese.

Von den vier verschiedenen Knochenmarkproben wurden insgesamt 177 Ausstrichpräparate ausgewertet. Dabei wurden ca. 110.000 Zellen differenziert.

Zellklassifikation

Erythropoese:

Proerythroblast	(PE)
basophiler Erythroblast	(bE)
polychromatischer Erythroblast	(pE)
oxyphiler Erythroblast	(oE)
reifer Erythroblast	(rE)
Promegaloblast	(PM)
basophiler Megaloblast	(bM)
polychromatischer Megaloblast	(pM)
oxyphiler Megaloblast	(oM)

Granulopoese:

Myeloblast	(Mbl)
Promyelozyt	(Promy)
neutrophiler Myelozyt	(My)
eosinophiler Myelozyt	(eoMy)
Metamyelozyt	(Mm)
Promonozyt	(Promono)
stabkerniger Granulozyt	(St)
segmentkerniger Granulozyt	(Seg)
eosinophiler segmentkern. Gran.	(eoSeg)
basophiler segmentkern. Gran.	(baSeg)
Monozyt	(Mo)
Makrophage	(Mph)

Übrige Zellen:

Lymphozyten	(Ly)
kleine Retikulumzelle	
große Retikulumzelle	
Plasmazelle	
Megakaryoblast	
Megakaryozyt	

Statistik

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen, die sich im Laufe der Kulturzeit zwischen Kontroll- und Zusatzwerten ergaben, statistisch signifikant waren, wurde das x^2-Verfahren nach PEARSON angewandt, dem folgende Formel zugrunde liegt:

$$x^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

Dabei ist: B = Beobachtungswert
E = Erwartungswert

Der zu x^2 gehörende p-Wert wird unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades aus einer mathematischen Tafel entnommen (5 ,17). Der Unterschied zweier zu vergleichender Ergebnisse ist dann ausreichend verschieden und signifikant, wenn der entsprechende p-Wert unter einer im einzelnen willkürlich festgelegten Grenze liegt. In dieser Arbeit gelten für die Beurteilung folgende Grenzen:

	p >	0,05	keine Signifikanz	ø
0,05 >	p >	0,01	Signifikanz zweifelhaft	(ø)
0,01 >	p >	0,001	Sign. einigermaßen sicher	(+)/(-)
	p <	0,001	Signifikanz gesichert	+ / -

4. ERGEBNISSE

4.1. Versuch 1 KM bei Sideroblastischer Anämie

ERYTHROPOESE

Eigen - Serumzusatz bewirkt eine signifikante Vermehrung der PE, bE und pE am 2.Tag gegenüber der Kontrolle (Abb.1, Tab.1). Am 7. und 9.Tag sind die pE und oE signifikant vermehrt. Am 11. Tag zeigt die Kultur eine Ausreifung zugunsten der reifen Erythroblasten.
Der rote Mitose - Index ist für die gesamte Kulturdauer im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb.5).

CML - Serumzusatz hat keine stimulierende Wirkung auf die Erythropoese. Bis zum 2.Tag sind alle Zellklassen statistisch signifikant vermindert (Abb.2, Tab.2). Dies setzt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum fort. Vom 7.Tag an kommt es zur Zelldegeneration, was am 9.Tag zu einem relativen Zuwachs der PE und bE führt.
Der rote Mitose - Index sinkt am 2.Tag auf Null. Danach treten keine Mitosen mehr auf.

In der AB - Plasma-Kultur kommt es nach einem Abfall der teilungsfähigen Erythroblasten am 9.Tag zu einem starken Anstieg der bE (Abb.1,2), der von einem Anstieg des G/E-Index begleitet wird (Tab.11).

GRANULOPOESE

Eigen - Serumzusatz zeigt bis zum 4.Tag eine Stimulation der Granuloblasten gegenüber der Kontrolle (Abb.3). Die Zahl der Myelozyten ist bis zum 7.Tag, die der Metamyelozyten bis zum 11.Tag statistisch signifikant erhöht (Tab.1). Am 7.Tag kommt es zur Ausreifung der Zellen mit signifikanter Vermehrung der Stabkernigen, Segmentkernigen sowie der Monozyten und Makrophagen.

Der weiße Mitose - Index liegt während der gesamten Kulturdauer über dem Wert der Kontrolle (Abb.5).

CML - Serumzusatz führt bis zum 7.Tag zu einer Vermehrung der Granuloblasten. Statistisch signifikant erhöht sind die Zahlen der Myeloblasten (am 7.Tag), der Promyelozyten (2.-7.Tag), der Myelozyten (am 2.Tag) und der Metamyelozyten (2.-11.Tag), ersichtlich in Abb.4 und Tab.2. Bereits am 4.Tag kommt es zu einer Ausreifung der Zellen mit signifikanter Vermehrung der stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten in der Versuchskultur.
Der weiße Mitose - Index unter CML-Serumzugabe ist fast identisch mit dem bei Eigen-Serumzugabe und ist ebenso über den gesamten Zeitraum gegenüber AB-Plasma erhöht (Abb.5).

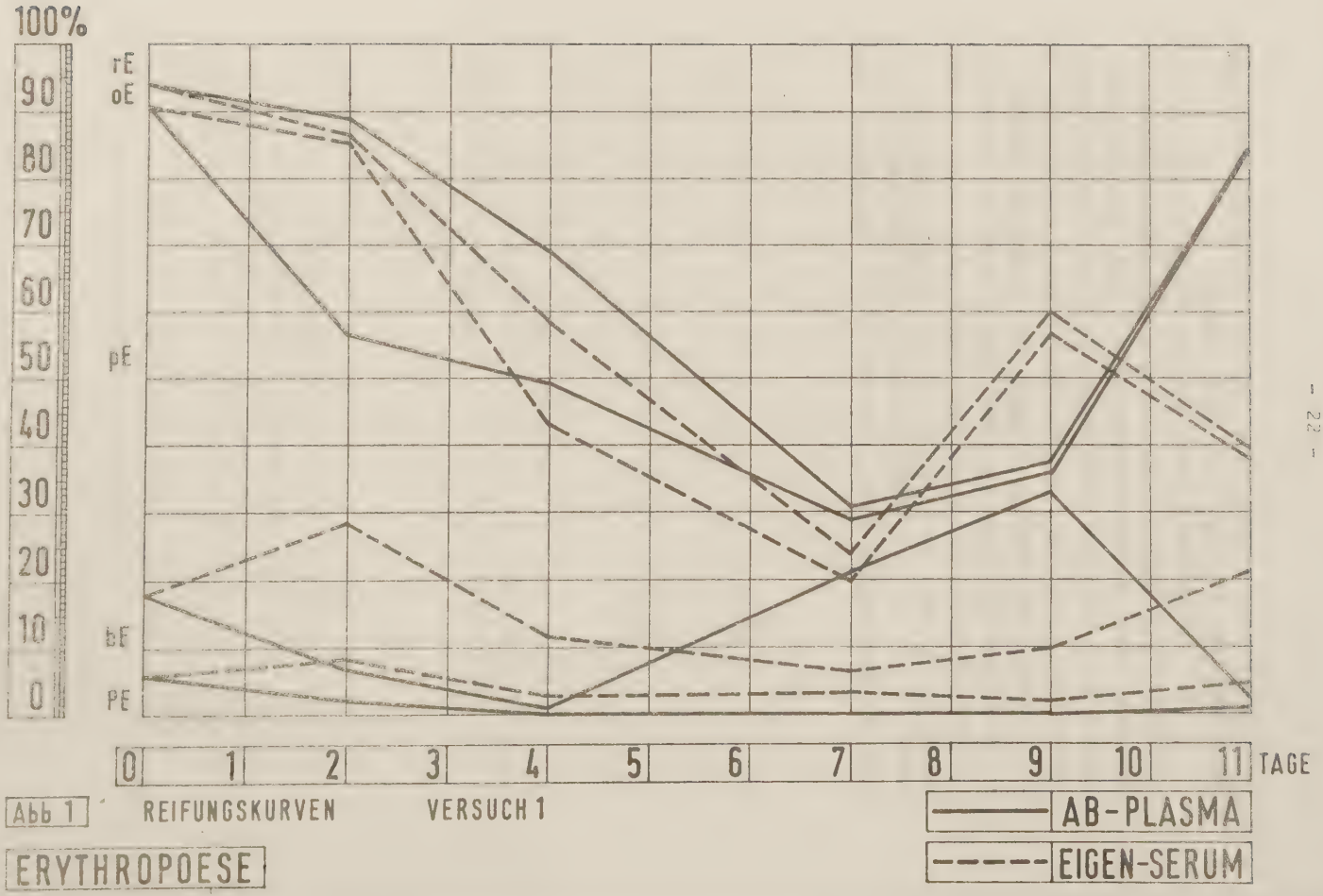


Abb 1 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 1

ERYTHROPOESE

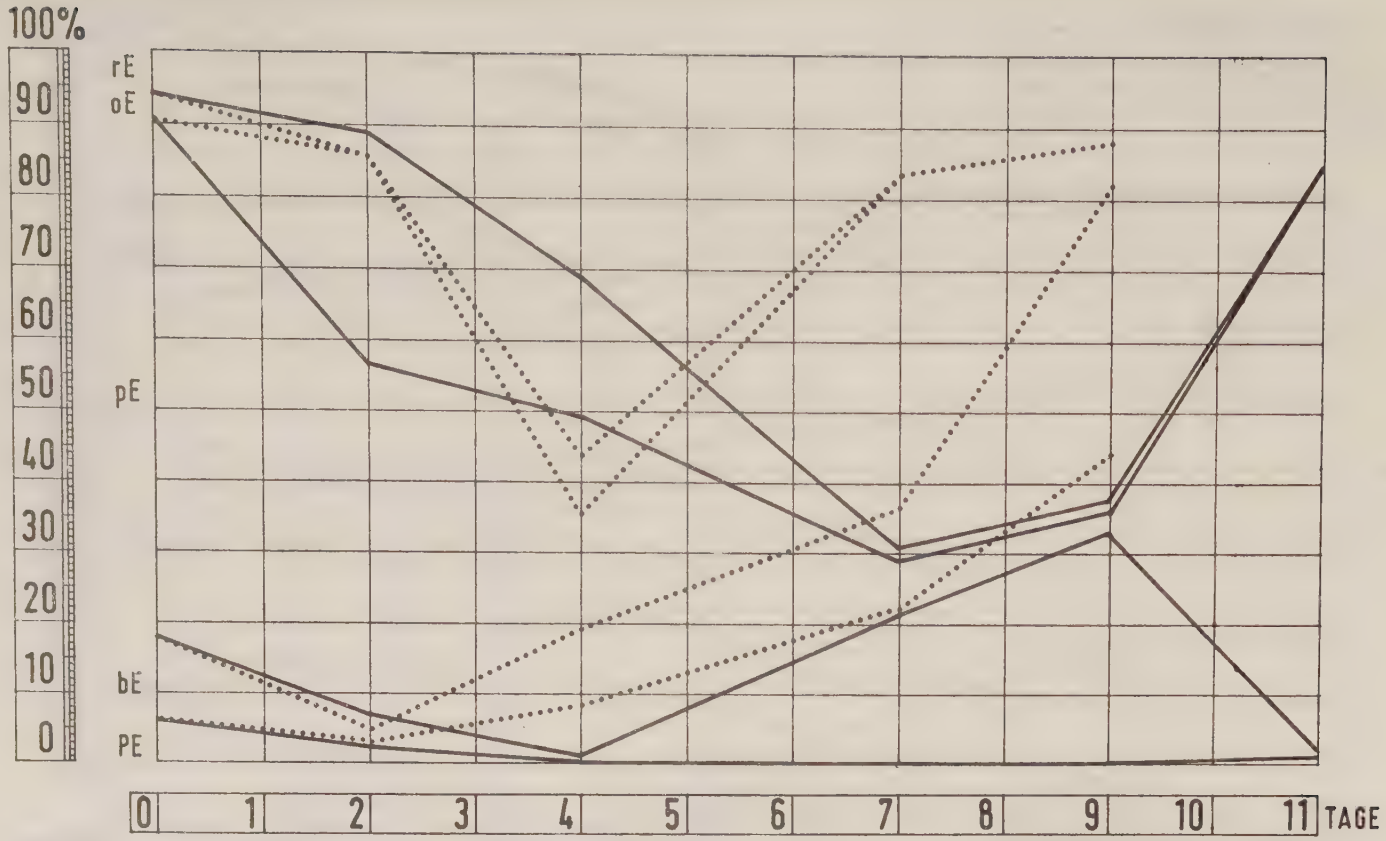


Abb 2 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 1

ERYTHROPOESE

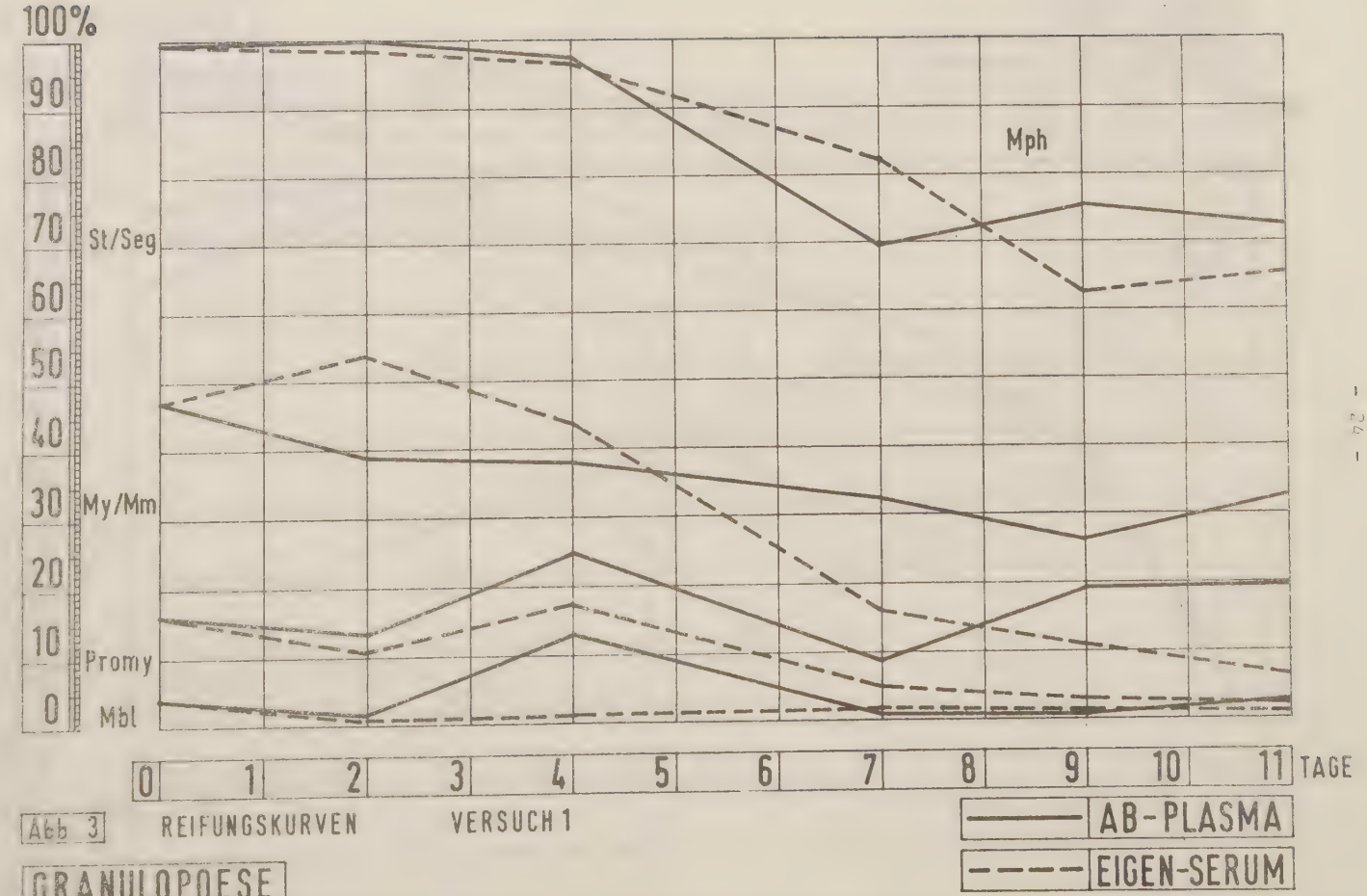


Abb 3 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 1

GRANULOPOESE

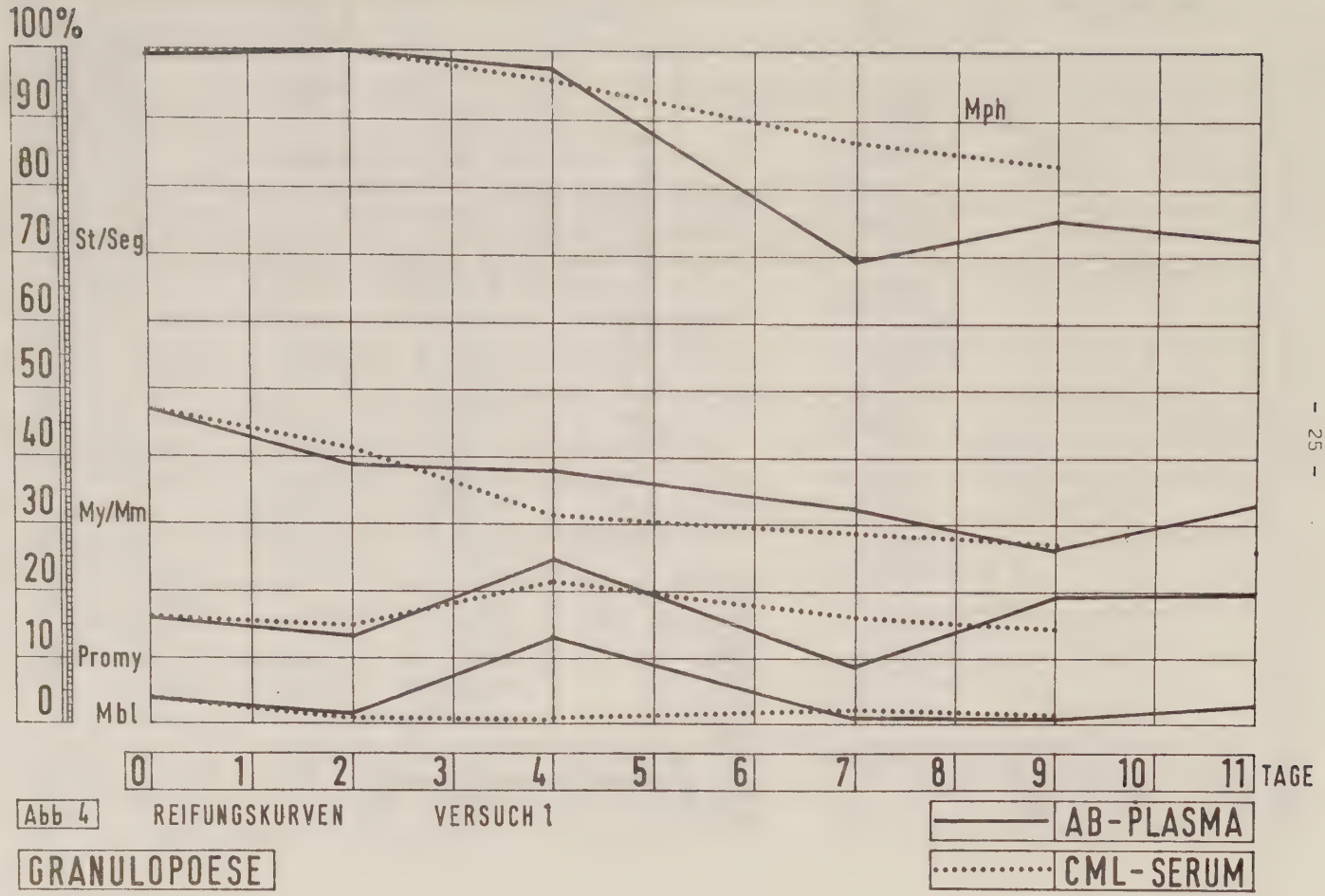
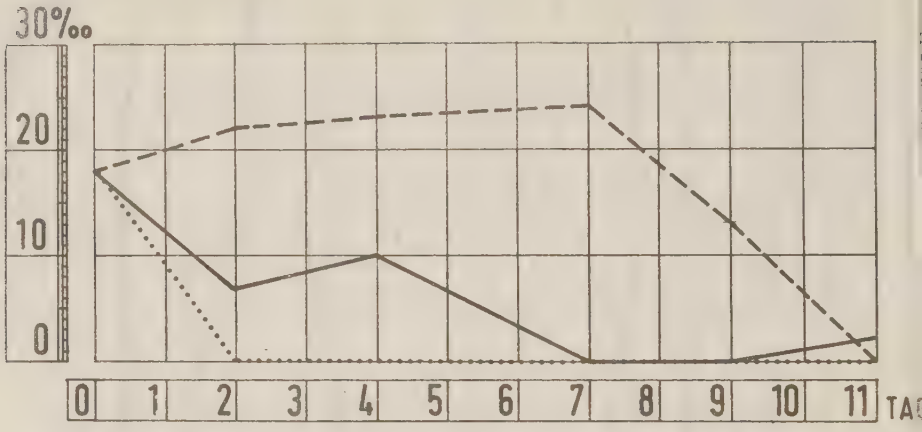


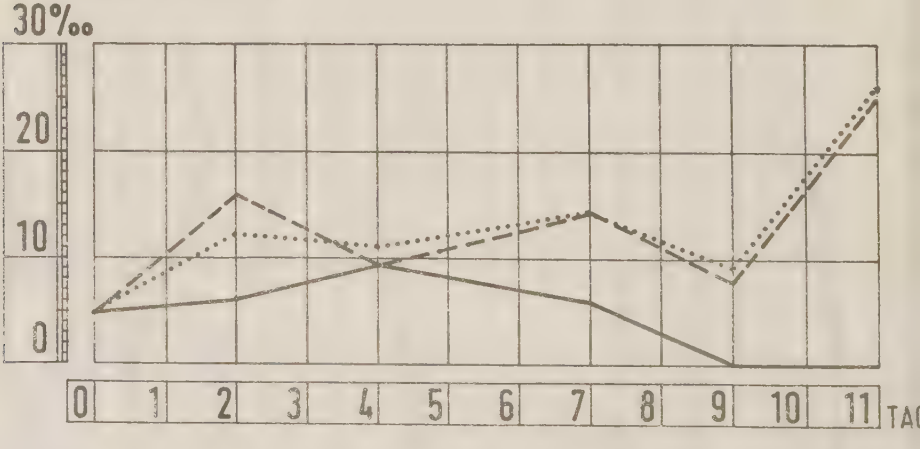
Abb 4 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 1

GRANULOPOESE

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE



AB-PLASMA
EIGEN-SERUM
CML-SERUM

Abb 5 MITOSE-INDICES VERSUCH 1

Tabelle 1: Signifikanzbestimmung - Versuch 1 : Eigen-Serum gegen AB-Plasma

	2d		4d		7d		9d		11d	
	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
Proeb.	<0,001	+	0,05>p>0,01	(ø)	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø	>0,05	ø
bas.Eb.	<0,001	+	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	-	>0,05	ø	>0,05	ø
poly.Eb.	<0,001	+	0,01>p>0,001	(-)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	-
oxy.Eb.	<0,001	-	>0,05	ø	<0,001	+	>0,05	ø	>0,05	ø
reife Eb.	>0,05	ø	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-
gesamt	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	-
Myelobl.	>0,05	ø	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	>0,05	ø
Promy.	0,01>p>0,001	(-)	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-
Myeloc.	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	+	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,05>p>0,01	(ø)
eos.	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø	>0,05	ø
Metamy.	0,01>p>0,001	(+)	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	+	<0,001	+	0,01>p>0,001	(+)
gesamt	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	-	<0,001	-
Stabk.	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Segk.	>0,05	ø	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
eos.	>0,05	ø	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	-	<0,001	-
akroph.	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	+	<0,001	+
Monoc.	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	0,01>p>0,001	(+)	0,01>p>0,001	(+)
gesamt	<0,001	-	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Gran.ges.	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+

Tabelle 2: Signifikanzbestimmung - Versuch 1 : CML-Serum gegen AB-Plasma

	2d		4d		7d		9d		11d	
	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
Proeb.	0,01>p>0,001	(-)	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
bas.Eb.	<0,001	-	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-
poly.Eb.	<0,001	-	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	<0,001	-
oxy.Eb.	<0,001	-	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø		
reife Eb.	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-
gesamt	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-
yelobl.	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	+	>0,05	ø	>0,05	ø
Promy.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	-
yeloc.	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)
eos.	<0,001	-	>0,05	ø	>0,05	ø			>0,05	ø
etamy.	<0,001	+	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
gesamt	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø
Stabk.	0,01>p>0,001	(-)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
segk.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
eos.	0,01>p>0,001	(-)	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-	<0,001	-
akroph.			>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø
onoc.			>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
gesamt	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Gran.ges.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	

4.2. Versuch 2 KM bei Eisenmangel-Anämie

ERYTHROPOESE

Eigen - Serumzusatz führt am 2.Tag zu einer statistisch signifikanten Zunahme der frühen Erythroblastenformen vom PE bis zum pE (Abb.6, Tab.3) gegenüber der AB-Plasmakultur. Am 4.Tag zeigt sich eine signifikante Vermehrung der reifen Erythroblasten. Am 7.Tag kommt es zu einem Anstieg der PE-, bE- und oE-Zahlen gegenüber dem Ausgangswert. Dieser Proliferationsschub zeichnet sich in einem Anstieg des roten Mitose-Index am 4.Tag ab (Abb.10). Zum Ende der Kultur am 9.Tag erfolgt eine Reifung mit Vermehrung der pE. Vom 7.Tag an treten Megaloblasten in der Kultur auf, wobei stets die polychromatischen Megaloblasten den größten Anteil ausmachen (37-47% der Erythroblasten).
Der rote Mitose - Index ist über die gesamte Kulturdauer von 11 Tagen erhöht mit einem Maximum am 4.Tag von 65 ‰ trotz vorwiegend reifer Erythroblasten (Abb.10).

CML - Serumzusatz bewirkt keine Veränderung der Erythroblastenzusammensetzung gegenüber der Kontrolle. Am 2.Tag entspricht die Verteilung der Zellen etwa derjenigen in der Kontrollkultur (Abb.7, Tab.3). Am 4.Tag zeigt sich eine leichte Vermehrung der pE und rE. Zum Ende der Kultur am 7.Tag ergibt sich eine Vermehrung der bE.
Der rote Mitose - Index fällt bereits am 2.Tag auf Null und verharrt auf diesem Wert wie bei der AB-Plasma-Kultur (Abb.10).

GRANULOPOESE

Eigen - Serumzusatz bewirkt eine statistisch signfikante Vermehrung der Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten gegenüber der Kontrolle bis zum 4.Tag (Abb.8, Tab.3). Danach bleibt die Zellverteilung rekativ konstant bis zum Absterben der Kultur nach dem 9.Tag.
Der weiße Mitose - Index liegt bei Eigen-Serumzugabe während der ganzen Kulturdauer über dem Wert der Kontrolle mit einem Maximum am 4.Tag (Abb.10).

CML - Serumzugabe bewirkt eine starke Vermehrung der Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten, die bis zum 4.Tag statistisch hoch signifikant ist (Abb.9, Tab.3). Vom 4.-9.Tag erfolgt eine verstärkte Ausreifung der Zellen, ersichtlich an der ständigen Zunahme der Stabkernigen und Segmentkernigen.
Der weiße Mitose - Index ist bei CML-Serumzugabe während der Kultvierung relativ konstant erhöht gegenüber der Kontrolle mit einem Maximum am 7.Tag (Abb.10).

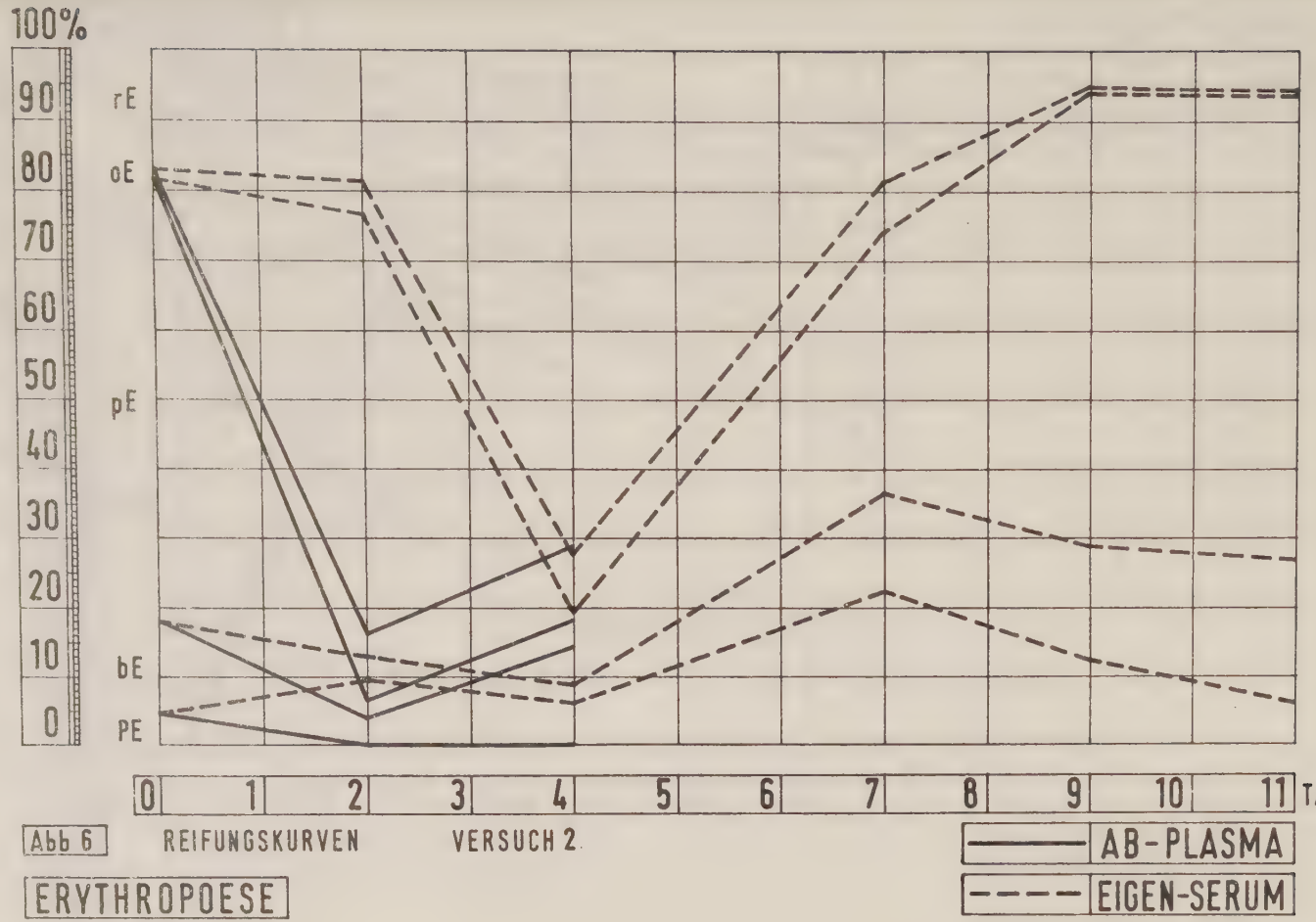


Abb 6 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 2

ERYTHROPOESE

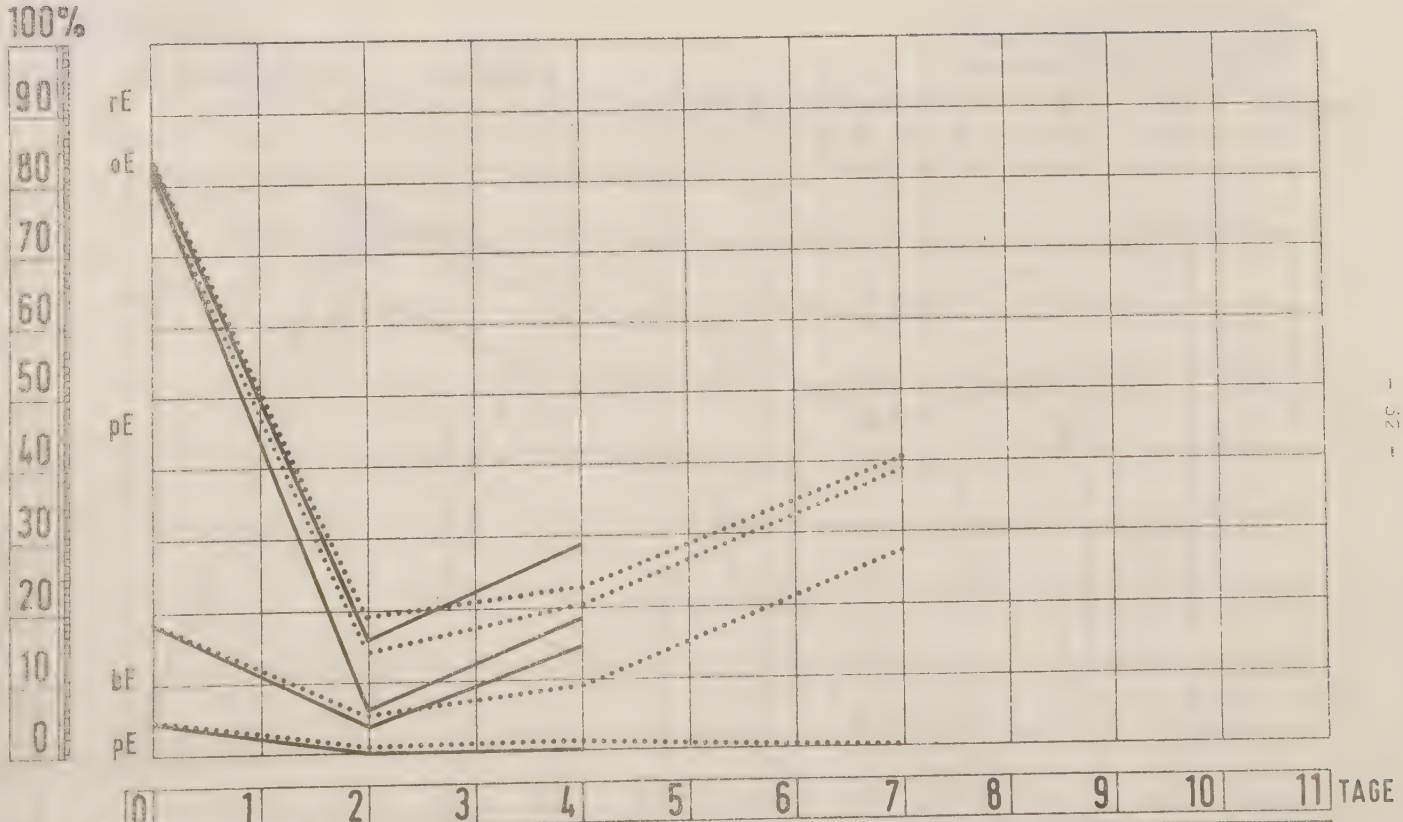


Abb 7 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 2

ERYTHROPOESE

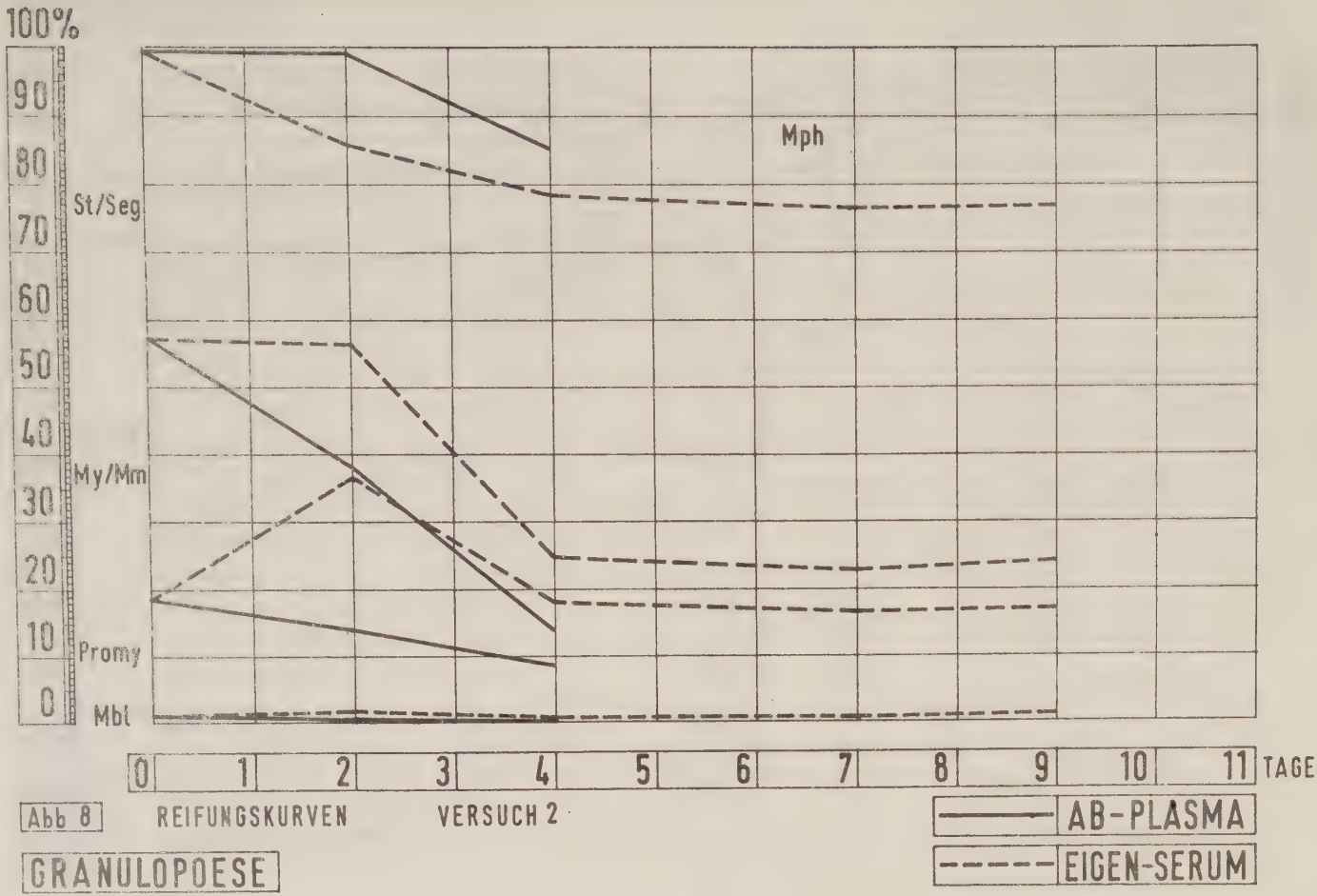


Abb 8 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 2

GRANULOPOESE

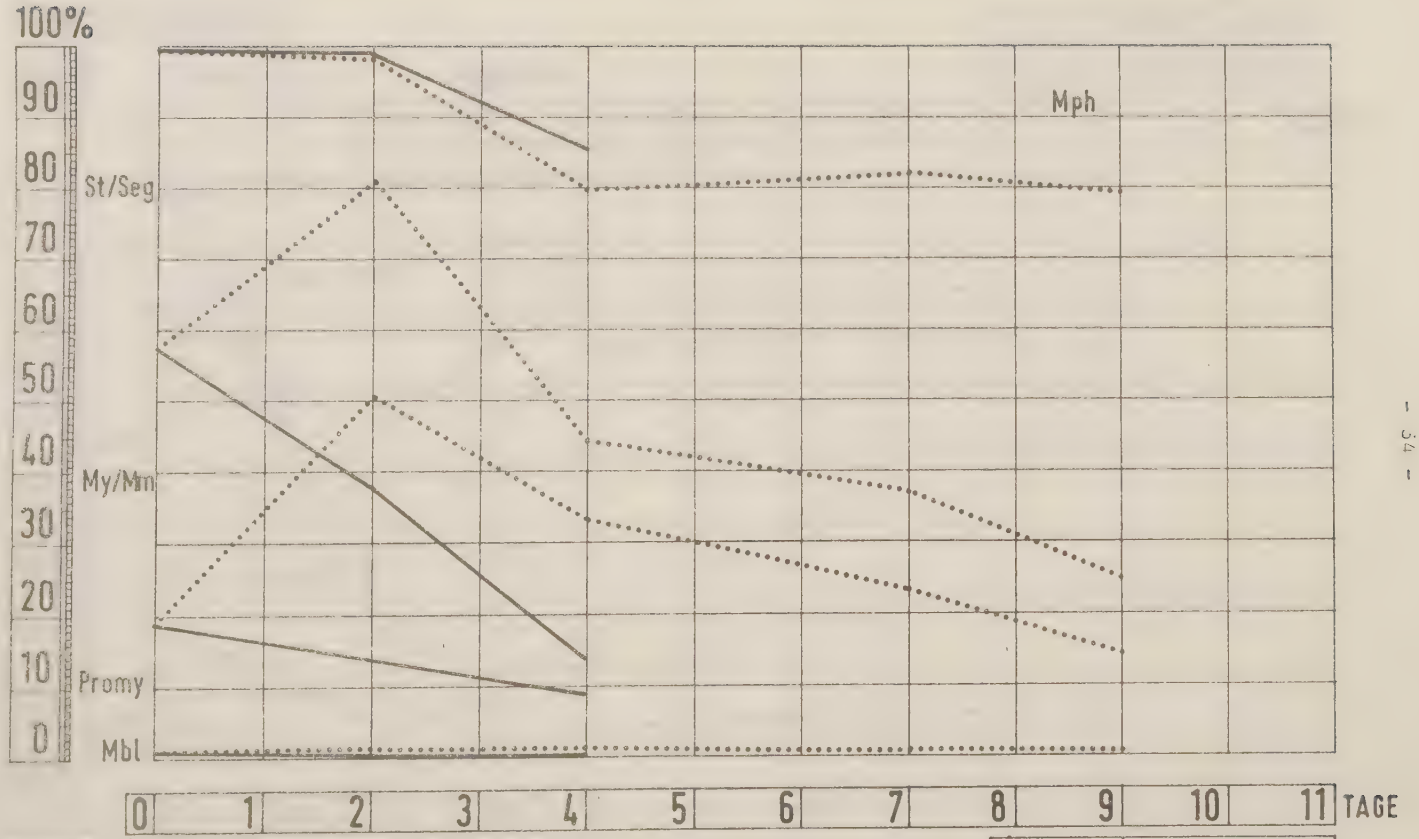


Abb 9 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 2

GRANULOPOESE

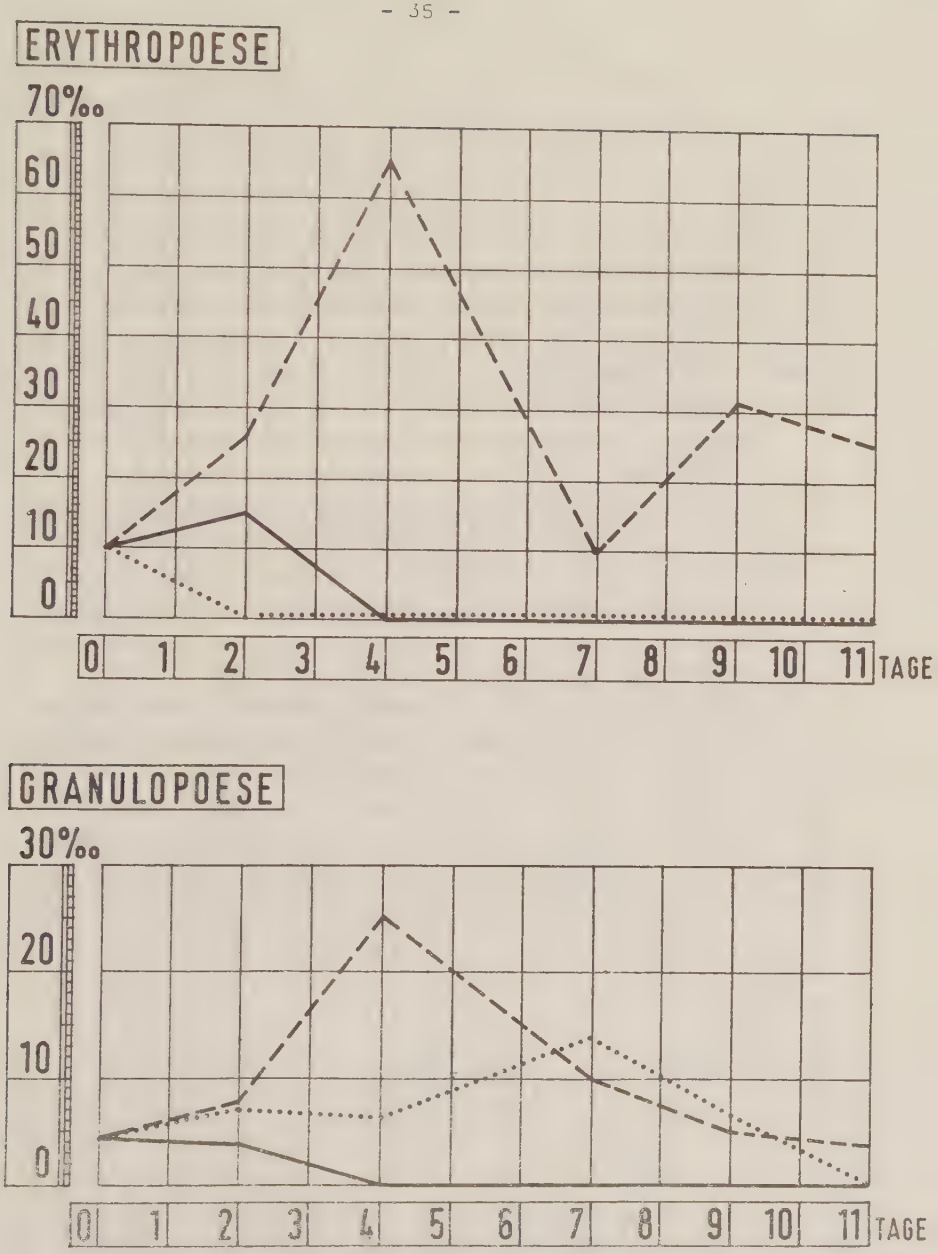


Abb 10 MITOSE-INDICES VERSUCH 2

Tabelle 3 : Signifikanzbestimmung - Versuch 2

Eigen-Serum gegen AB-Plasma

	2d p	Sig.	4d p	Sig.
Proeb.	<0,001	+	<0,001	+
bas.Eb.	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø
poly.Eb.	<0,001	+	<0,001	+
oxy.Eb.	>0,05	ø	>0,05	ø
reife Eb.	<0,001	-	<0,001	+
gesamt	<0,001	+	<0,001	+
yelobl.	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø
romy.	<0,001	+	<0,001	+
yeloc.	<0,001	-	>0,05	ø
eos.	<0,001	-	<0,001	-
etamy.	<0,001	-	<0,001	+
esa t	>0,05	ø	<0,001	+
tack.	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)
eg.	<0,001	-	<0,001	-
eos.	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	-
kroph.	<0,001	+	<0,001	+
onoc.	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø
gesamt	<0,001	-	<0,001	-
ran.ges.	<0,001	-	>0,05	ø

C L-Serum gegen AB-Plasma

2d p	Sig.	4d p	Sig.
>0,05	ø	>0,05	ø
>0,05	ø	>0,05	ø
>0,05	ø	>0,05	ø
<0,001	-	>0,05	ø
<0,001	-	>0,05	ø
<0,001	-	>0,05	ø
>0,05	ø	>0,05	ø
<0,001	+	<0,001	+
<0,001	+	<0,001	+
<0,001	-	<0,001	+
>0,05	ø	<0,001	+
<0,001	+	<0,001	+
<0,001	-	>0,05	ø
<0,001	-	<0,001	-
0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	-
<0,001	+	<0,001	+
<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)
<0,001	-	<0,001	-
<0,001	+	<0,001	+

4.3. Versuch 3 KM bei Perniziöser Anämie

ERYTHROPOESE

Eigen - Serum in der Zusatzkultur bewirkt während der gesamten Versuchsdauer eine starke Vermehrung der Erythroblasten und Megaloblasten mit Ausnahme der Reifen, die bis zum 9.Tag statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle ist (Abb.11, Tab.4). Am 9.Tag kommt es darüberhinaus zu einem deutlichen Anstieg der bE-Prozentzahl, begleitet von einem Anstieg des roten Mitose - Index bis 43 % (Abb.15).Bis zuletzt sind die PE gegenüber der Kontrollkultur vermehrt. Bis zum 4.Tag bewegt sich der rote Mitose-Index unterhalb des Kontrollwertes, um vom 7.Tag deutlich anzusteigen, während bis zum Ende der Kultivierung mit Eigen-Serum am 11.Tag keine Mitosen mehr auftreten.

CML - Serum bewirkt eine Zunahme der erythropoetischen Zellen in der Kultur. Es ergibt sich eine statistisch signifikante Vermehrung der frühen Formen (PE und PM, bE und bM, pE und pM) am 2.Tag gegenüber der Kontrolle (Abb.12, Tab.5). Am 4. und 7.Tag sind die pE und pM, am 7.-11.Tag die oE und oM signifikant vermehrt gegenüber der Kontrollkultur. Der rote Mitose - Index liegt bei CML-Serumzusatz unterhalb der Kontrolle mit einer Ausnahme am 7.Tag mit 52,6 ‰ (Abb.15).

GRANULOPOESE

Eigen - Serum bewirkt eine leichte Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten bis zum 4.Tag gegenüber der Kontrolle (Abb.13, Tab.4). Signifikant zugenommen haben die Myeloblasten am 4.Tag und die Myelozyten am 2. und 4.Tag. Am 7.Tag setzt eine verstärkte Reifung im Vergleich zur Kontrollkultur ein, erkenntlich an der statistisch signifikanten Vermehrung der Stabkernigen, Segmentkernigen und Makrophagen, die bis zum 11.Tag anhält. Der weiße Mitose - Index liegt bis auf die Stichprobe am 7.Kulturtag über dem Kontrollwert (Abb.15).

CML - Serum bewirkt eine Stimulation der teilungsfähigen Granuloblasten bis zum 9.Tag. Eine statistisch signifikante Vermehrung gegenüber der Kontrolle ergibt sich für die Promyelozyten am 2.Tag, die Myelozyten vom 2.-9.Tag und die Metamyelozyten vom 4.-9.Tag (Abb.14, Tab.5). Vom 7.-11.Tag zeigt sich eine gesteigerte Ausreifung der Zellen mit statistisch signifikant erhöhten Werten für Stabkernige, Segmentkernige und Makrophagen gegenüber der Kontrolle.
Der weiße Mitose - Index ist am 2. und 7.Tag gegenüber der AB-Plasma-Kontrollkultur erhöht (Abb.15).

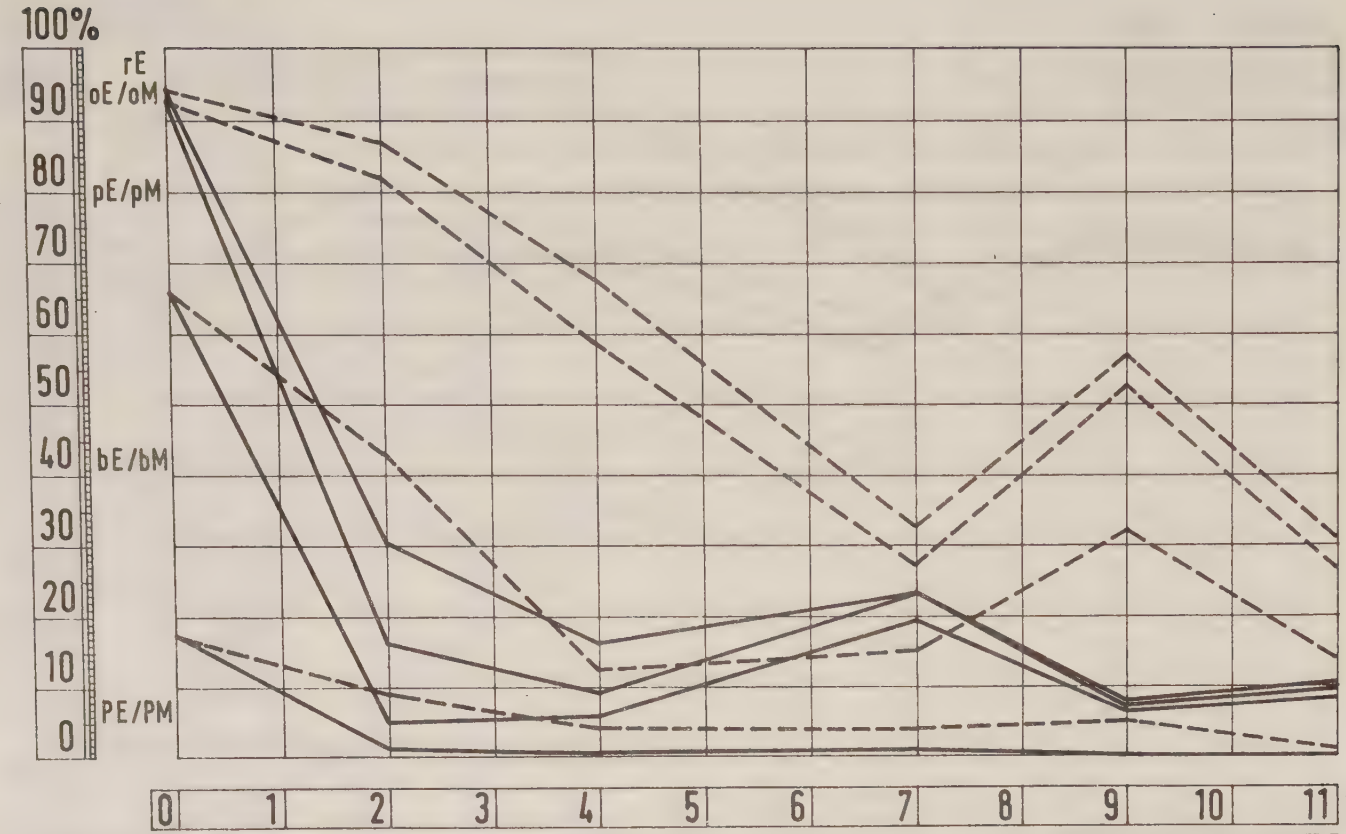


Abb 11 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 3

ERYTHROPOESE

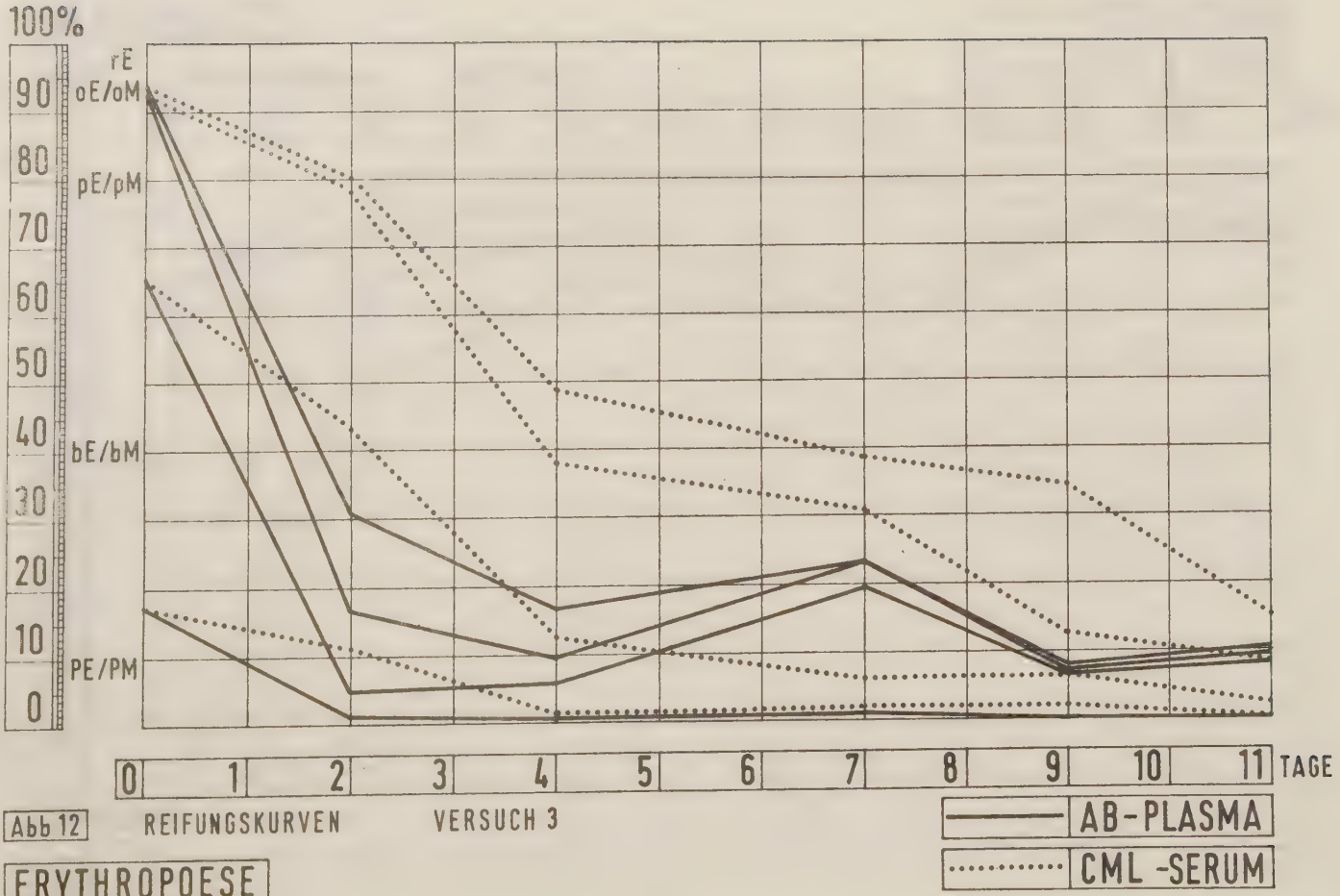


Abb 12 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 3

ERYTHROPOESE

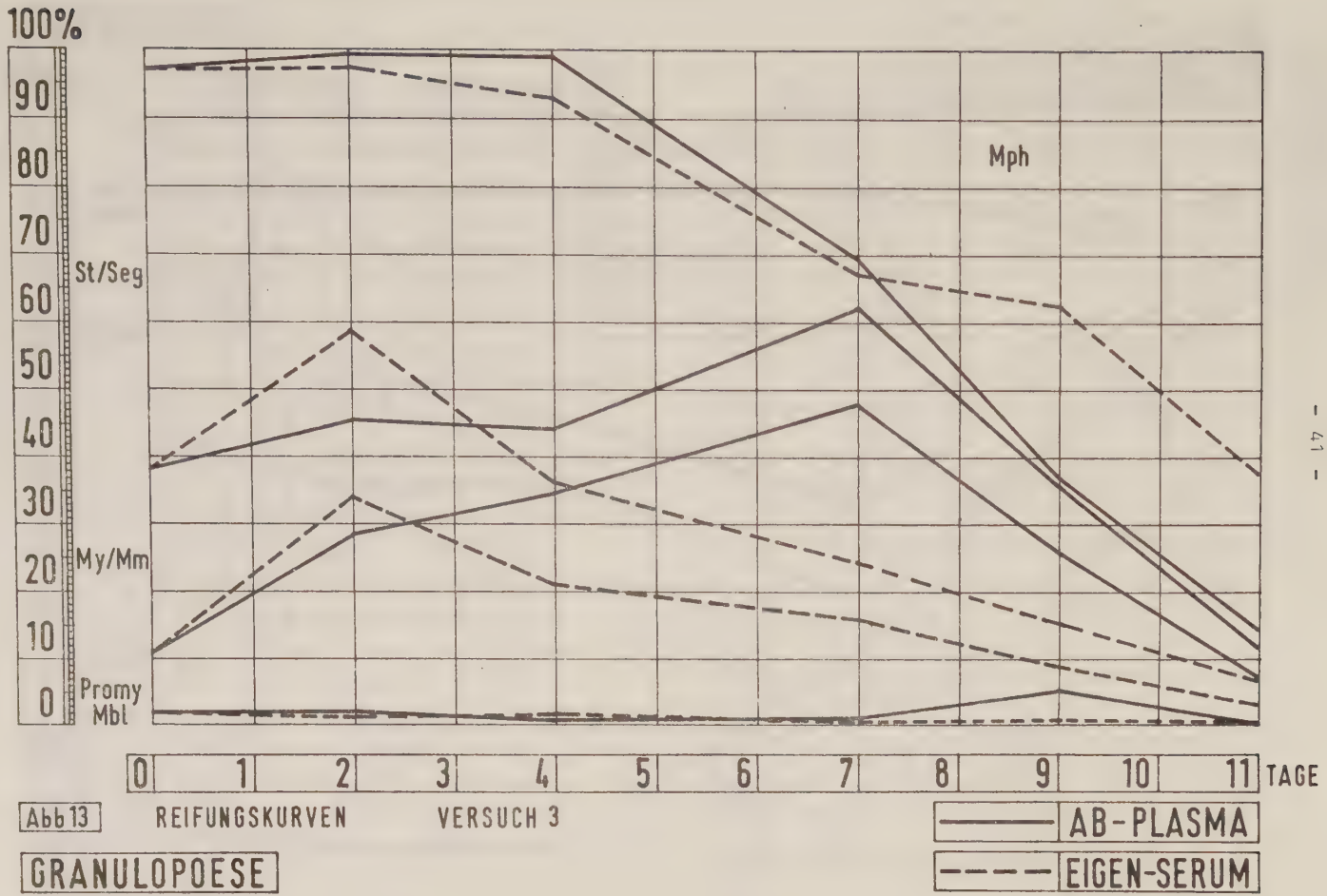


Abb 13 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 3

GRANULOPOESE

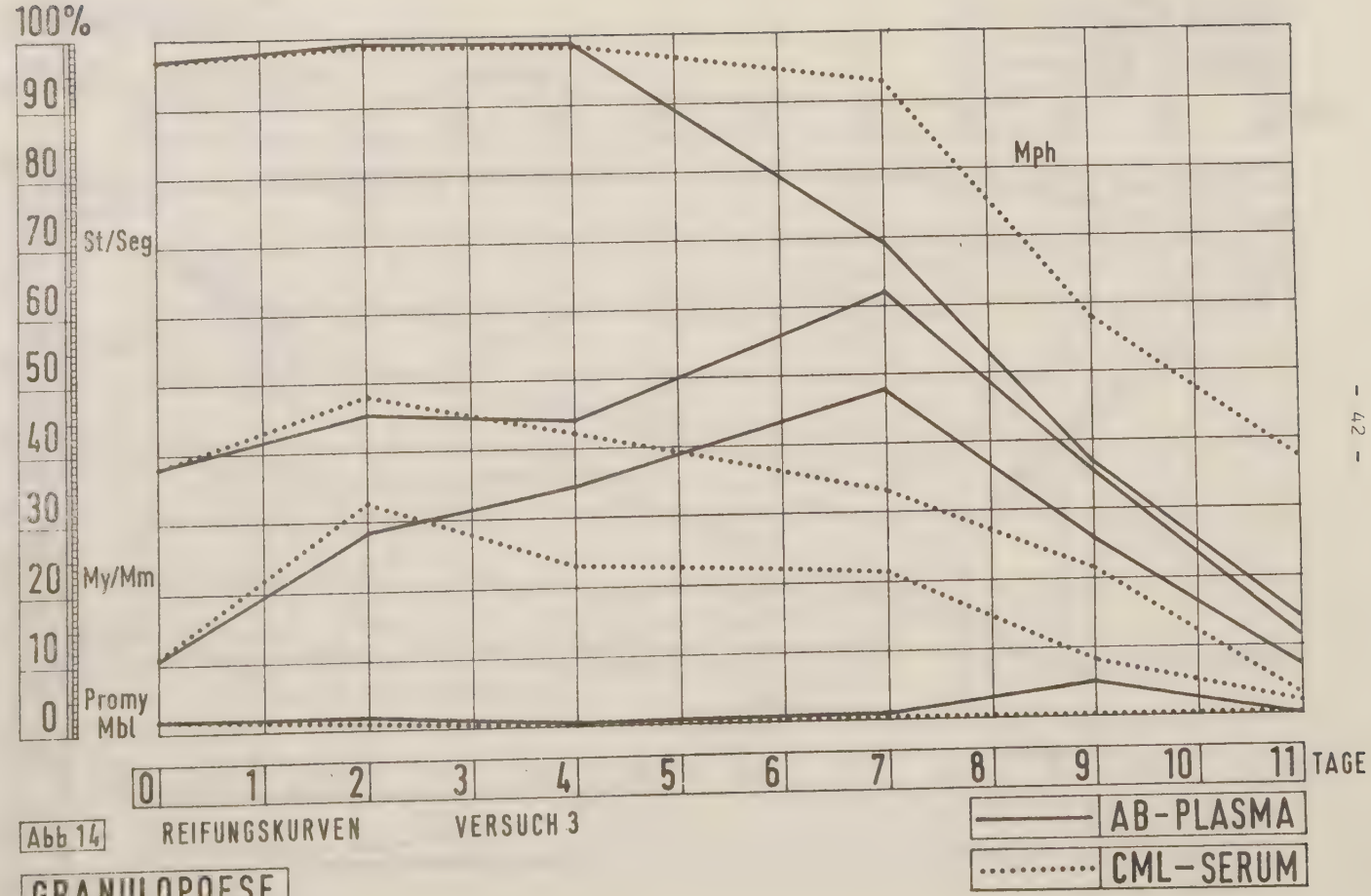


Abb 14 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 3

GRANULOPOESE

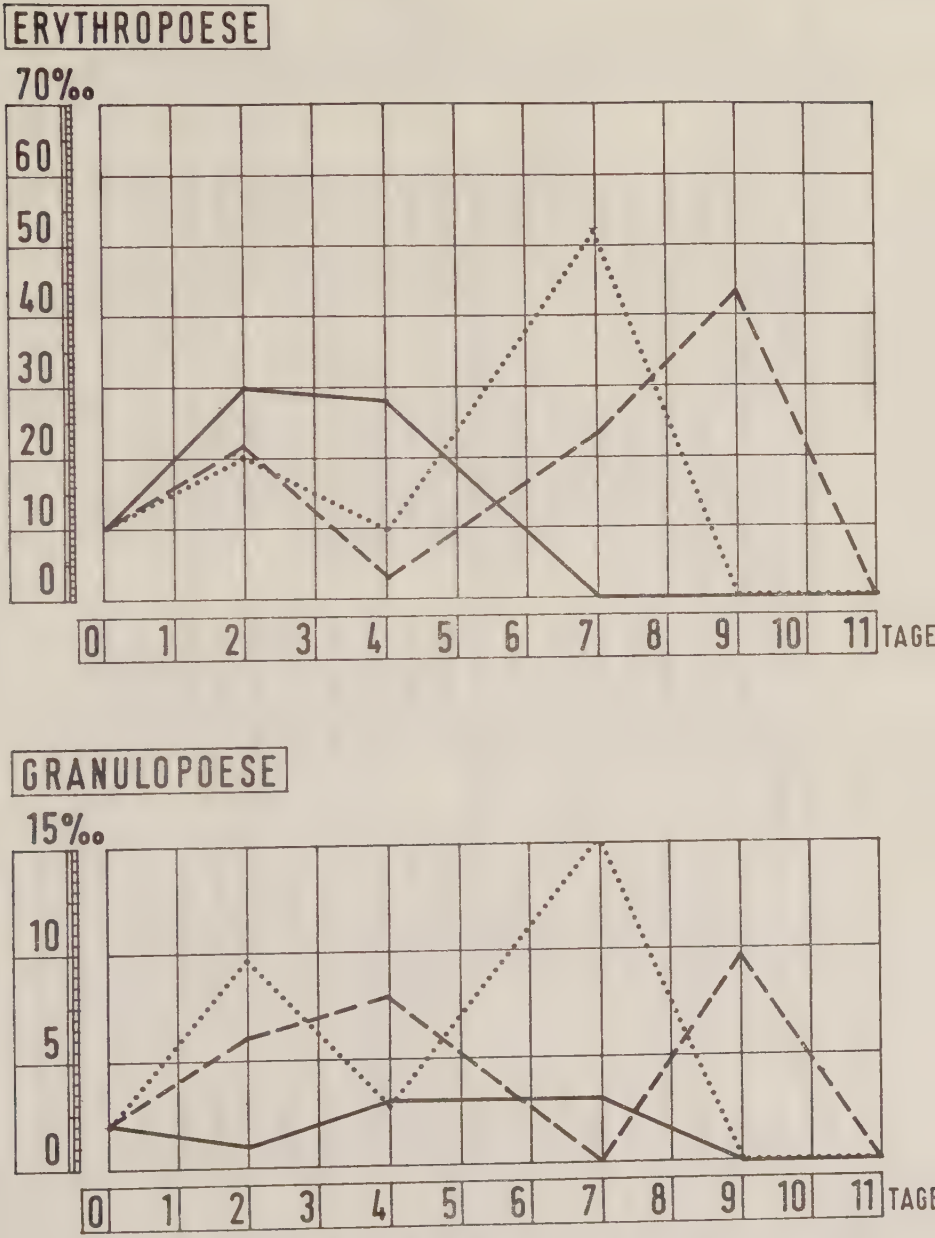


Abb 15 MITOSE-INDICES VERSUCH 3

Tabelle 4: Signifikanzbestimmung - Versuch 3 : Eigen-Serum gegen AB-Plasma

	2d		4d		7d		9d		11d	
	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
Proeb.	<0,001	+	<0,001	+	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	+	>0,05	ø
bas.Eb.	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	>0,05	ø
poly.Eb.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø
oxy.Eb.	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø
reife Eb.	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-
gesamt	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	-
yelobl.	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(-)	>0,05	ø
promy.	>0,05	ø	<0,001	-	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
myeloc.	<0,001	+	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+	>0,05	ø
metamy.	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	+	<0,001	+
gesamt	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	>0,05	ø
Stabk.	<0,001	-	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Segk.	<0,001	-	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
makroph.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
monoc.	>0,05	ø	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,01>p>0,001	(-)	>0,05	ø
gesamt	<0,001	-	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Gran.ges.	<0,001	-	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+

Tabelle 5 : Signifikanzbestimmung - Versuch 3 : CML-Serum gegen AB-Plasma

	2d		4d		7d		9d		11d	
	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
Proeb.	‹0,001	+	›0,05	ø	›0,05	ø	›0,05	ø	›0,05	ø
bas.Eb.	‹0,001	+	›0,05	ø	0,01›p›0,001	(-)	›0,05	ø	0,05›p›0,01	(ø)
poly.Eb.	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+	0,05›p›0,01	(ø)	0,05›p›0,01	(ø)
oxy.Eb.	‹0,001	-	›0,05	ø	‹0,001	+	‹0,001	+	0,01›p›0,001	(+)
reife Eb.	‹0,001	-	‹0,001	-	‹0,001	-	‹0,001	-	›0,05	ø
gesamt	›0,05	ø	›0,05	ø	0,01›p›0,001	(-)	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø
Myelobl.	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø	›0,05	ø	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø
Promy.	0,01›p›0,001	(+)	‹0,001	-	›0,05	ø	›0,05	ø	›0,05	ø
Myeloc.	‹0,001	+	‹0,001	+	›0,05	ø	‹0,001	+	›0,05	ø
eos.	›0,05	ø	0,01›p›0,001	(+)	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø	›0,05	ø
Metamy.	‹0,001	-	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+	›0,05	ø
gesamt	›0,05	ø	›0,05	ø	‹0,001	+	‹0,001	+	0,05›p›0,01	(ø)
Stabk.	‹0,001	-	›0,05	ø	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+
Segk.	‹0,001	+	›0,05	ø	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+
eos.	0,05›p›0,01	(ø)	‹0,001	+	‹0,001	+	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø
Makroph.	›0,05	ø	›0.05	ø	0,05›p›0,01	(ø)	‹0,001	+	‹0,001	+
Monoc.	›0,05	ø	0,05›p›0,01	(ø)	›0,05	ø	›0,05	ø	0,05›p›0,01	(ø)
gesamt	›0,05	ø	0,01›p›0,001	(+)	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+
Gran.ges.	›0,05	ø	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+	‹0,001	+

4.4. Versuch 4 KM bei Hämolytischer Anämie

ERYTHROPOESE

CML - Serum hat eine statistisch signifikante Zunahme der Proerythoblasten und basophilen Erythroblasten am 2.Tag gegenüber der Kontrolle bewirkt (Abb.16, Tab.6). Danach sinken die Zellzahlen zugunsten der reifen Erythroblasten. Es lassen sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsansatz und Kontrolle feststellen. Am Ende der Kultur am 9. und 11.Tag kommt es zu einem Anstieg der basophilen Erythroblasten, der aber nicht von einer entsprechenden Veränderung des roten Mitose-Index beleitet wird (Abb. 18). Dieser zeigt am 2.Tag einen niedrigeren Wert als die Kontrolle und fällt dann wie diese auf Null ab.

GRANULOPOESE

CML - Serumzugabe bewirkt eine starke Vermehrung der granulopoetischen Zellen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum sind die teilungsfähigen Granuloblasten statistisch signifikant vermehrt im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.17, Tab.6). Es setzt eine gesteigerte Ausreifung der Zellen mit signifikanter Vermehrung der Stabkernigen vom 4.-11.Tag und der Segmentkernigen vom 9.-11.Tag ein. Der weiße Mitose - Index erreicht zu jedem Zeitpunkt einen höheren Wert als die Kontrolle und zeigt erst ab 9.Tag eine abnehmende Tendenz (Abb.18).

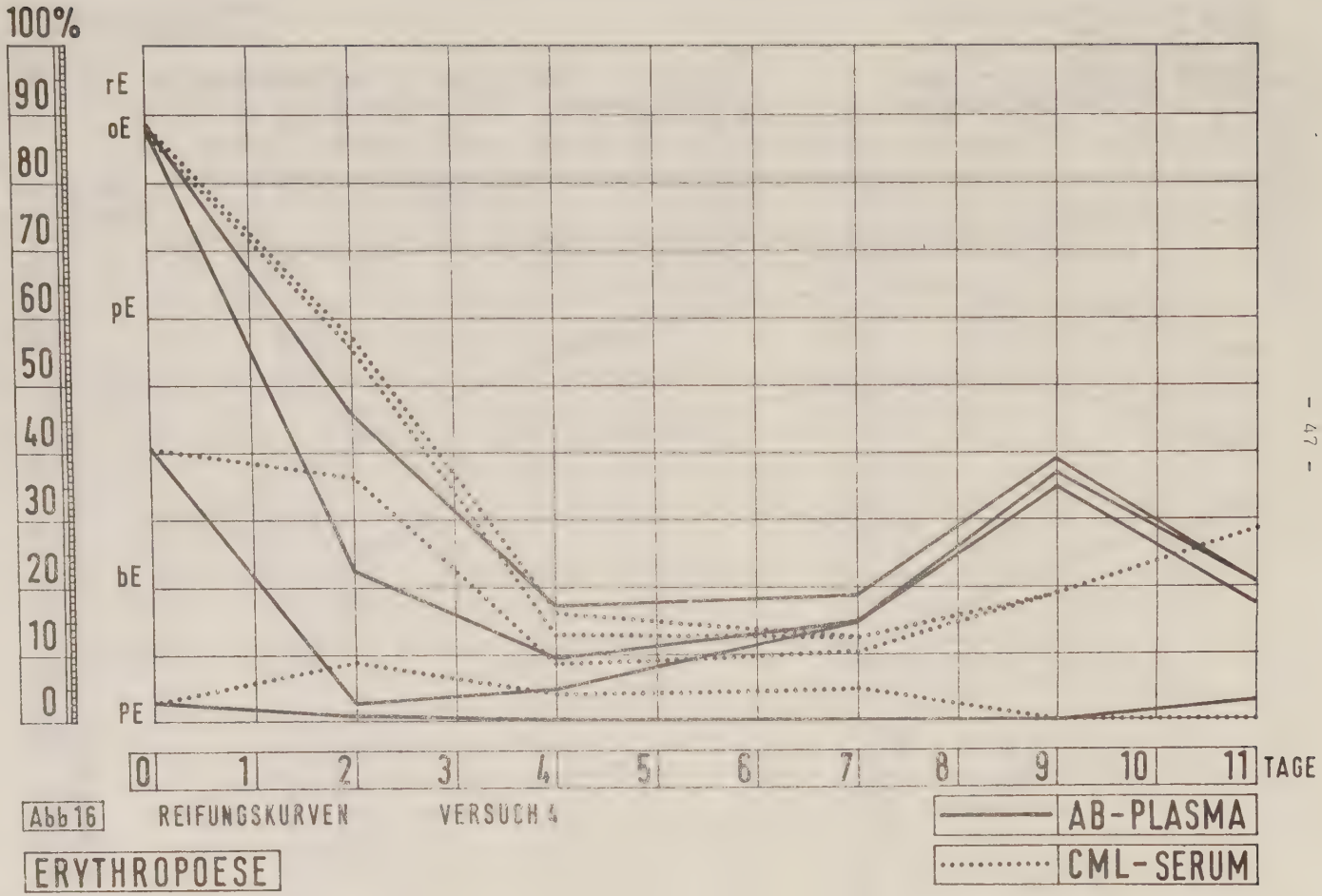


Abb 16 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 4

ERYTHROPOESE

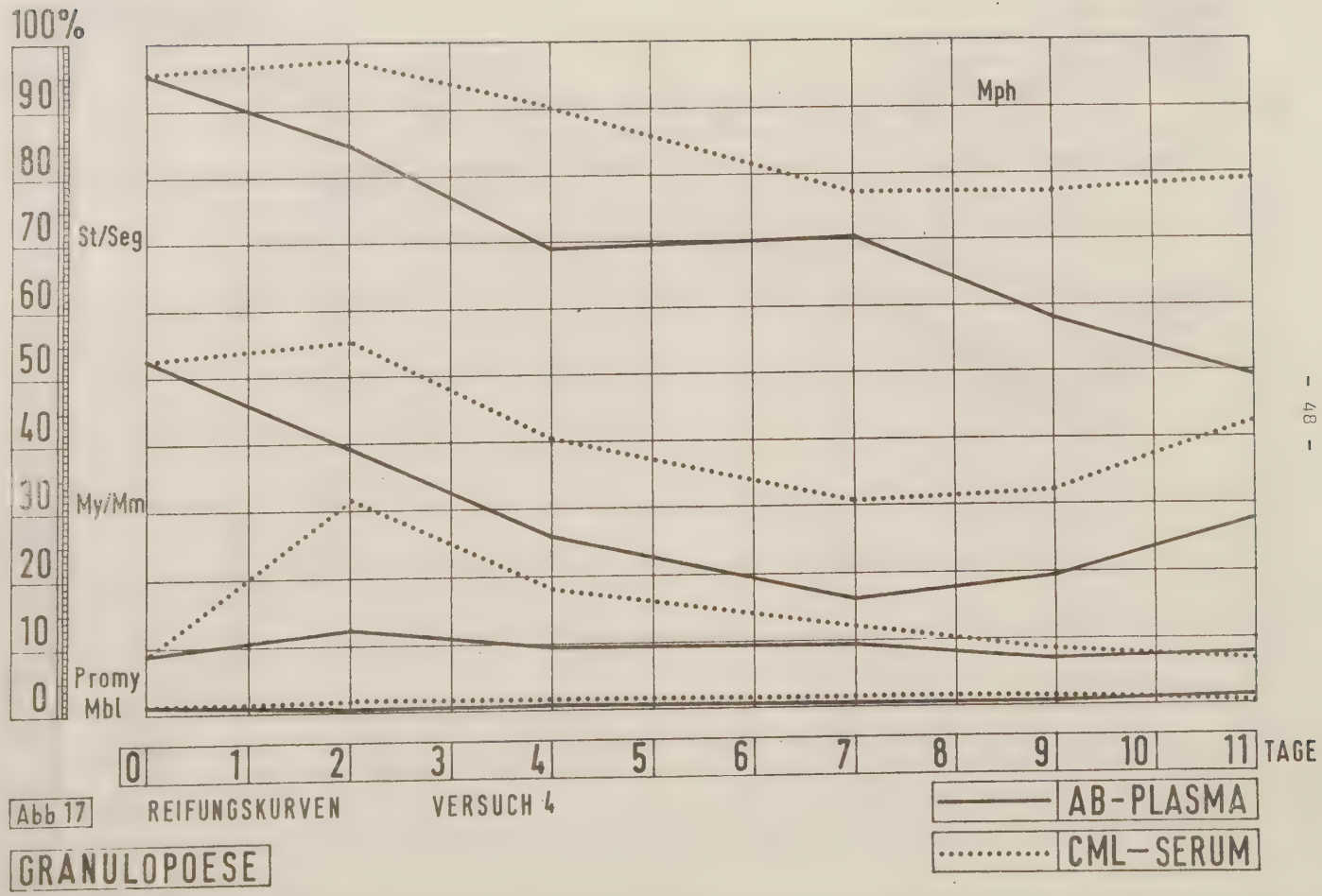


Abb 17 REIFUNGSKURVEN VERSUCH 4

GRANULOPOESE

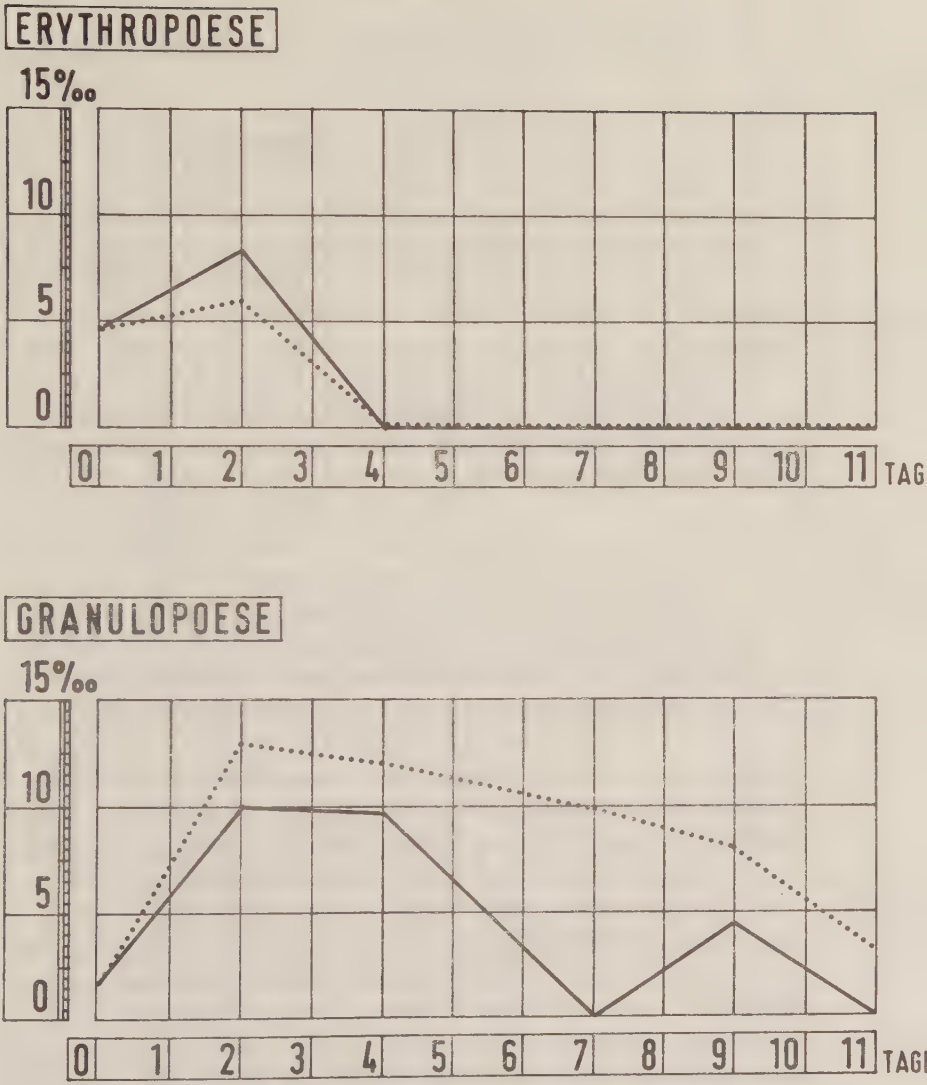


Abb 18 MITOSE-INDICES VERSUCH 4

Tabelle 6: Signifikanzbestimmung - Versuch 4 : CML-Serum gegen AB-Plasma

	2d		4d		7d		9d		11d	
	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
Proeb.	<0,001	+	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
bas.Eb.	<0,001	+	>0,05	ø	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,01>p>0,001	(+)
poly.Eb.	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
oxy.Eb.	<0,001	-	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø
reife Eb.	>0,05	ø	<0,001	-	>0,05	ø	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)
gesamt	>0,05	ø	<0,001	-	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	0,01>p>0,001	(+)
Myelobl.	<0,001	+	>0,05	ø	>0,05	ø	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)
Promy.	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	0,01>p>0,001	(+)	0,01>p>0,001	(+)
Myeloc.	0,01>p>0,001	(-)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Metamy.	>0,05	ø	>0,05	ø	<0,001	+	>0,05	ø	<0,001	+
gesamt	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
Stabk.	>0,05	ø	<0,001	+	<0,001	+	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	+
Segk.	>0,05	ø	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	+	<0,001	+
eos.	>0,05	ø	<0,001	+	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	-
Makroph.	<0,001	-	<0,001	-	>0,05	ø	<0,001	-	<0,001	-
Monoc.	<0,001	+	>0,05	ø	0,05>p>0,01	(ø)	>0,05	ø	>0,05	ø
gesamt	<0,001	-	<0,001	-	>0,05	ø	0,01>p>0,001	(+)	<0,001	+
Gran.ges.	<0,001	+	0,05>p>0,01	(ø)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

5.1. Erythropoese

Frisches Eigen - Serum bewirkt in allen ausgewerteten Reifungskurven eine gegenüber gefrorenem AB-Plasma statistisch signifikante Stimulation der Erythroblasten (Abb. 1,6,11). Im Vordergrund steht die Vermehrung der frühen Zellformen wie PE, bE und pE etwa bis zum 4.Tag gegenüber der Kontrolle. Vom 7.-9.Tag findet sich zusätzlich eine Vermehrung der oxyphilen oder reifen Erythroblasten im Sinne einer Ausreifung der Zellen. Zu einer zweiten Vermehrung von PE und / oder bE kommt es am 7.Tag in Versuch 2 und am 9.Tag in Versuch 3.
Die mittleren Mitose - Indices der Erythroblasten liegen bei Eigen-Serumzugabe während des gesamten Untersuchungszeitraumes deutlich über dem Kontrollwert (Abb.19, Tab.7,8). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Versuchsansatz und Kontrolle ergeben sich wegen der zu geringen Zahl der erfaßten Mitosen bei Zusammenfassung der Ergebnisse vom 2.-9. Tag und am 11.Tag (Tab.10).
Der mittlere G/E-Index in den Eigen-Serumkulturen bewegt sich entsprechend der vermehrten Erythropoese unterhalb der Kontrollwerte und zeigt eine leicht ansteigende Tendenz im Laufe der Kultivierung (Abb.20, Tab.11).

CML - Serum bewirkt in einem Fall (Versuch 3 - KM bei perniziöser Anämie) eine deutliche Stimulation der Erythropoese mit signifikanter Vermehrung der frühen Erythro- und Megaloblastenformen zu Beginn (2.Tag), der pE/pM im weiteren Verlauf (4.-7.Tag) und der oE/oM am Ende der Kultur (7.-11.Tag) gegenüber der Kontrolle. In einem weiteren Fall (Versuch 4 - KM bei hämolytischer Anämie) findet sich am 2.Tag eine statistisch signifikante Vermehrung der PE und bE gegenüber der Kontrolle als Ausdruck einer stimulierenden Wirkung von CML-Serum. In den anderen beiden Versuchen (KM bei sideroblastischer und Eisen-Mangel-Anämie) zeigt sich in den CML-Serumzusatzkulturen kein statistisch signifikanter Stimulationseffekt in den Reifungskurven der

der Erythropoese im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit AB-Plasma.
Der mittlere rote Mitose - Index liegt bei CML-Serumzusatz bis zum 7.Tag relativ gleichbleibend mit einer Ausnahme am 4.Tag wenig erhöht über dem Kontrollwert (Abb.19, Tab.7,9). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle ergeben sich nicht (Tab.10).
Der mittlere G/E - Index zeigt bei CML-Serumzugabe bis zum 9.Tag einen starken Anstieg und liegt trotz eines Rückganges am 11.Tag deutlich über den Werten der Kontrollkultur mit AB-Plasma (Abb.20, Tab.11).

5.2. Granulopoese

Eigen - Serumzusatz zeigt in allen Reifungskurven eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten (Abb.3,8,13). Es sind in den ersten Kulturtagen (2.-7.Tag) die Myeloblasten in Versuch 3, die Promyelozyten in Versuch 2 und die Myelozyten in Versuch 1 und 3 statistisch signifikant vermehrt. Mit weiterer Kulturdauer vom 7.-11.Tag erscheinen die Metamyelozyten, die Stab- und Segmentkernigen (Versuch 1 und 3) signifikant vermehrt gegenüber der Kontrolle als Ausdruck einer Reifungsförderung.
Die mittleren weißen Mitose - Indices liegen bei Eigen-Serumzugabe bis zum 9.Tag über den Werten der Kontrollkulturen, zeigen aberkeine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb.19, Tab.7,8,10).
Das Verhalten der mittleren G/E-Indices bei Eigen-Serumzugabe wurde oben schon erwähnt (abb.20, Tab.11).

CML - Serumzusatz bewirkt in allen vier Versuchen eine starke Stimulation der Granulopoese. Dies wird sichtbar in einer statistisch signifikanten Vermehrung von teilungsfähigen Granuloblasten wie Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten gegenüber der Kontrolle bis etwa zum 7.Tag (in Versuch 4 bis zum 11.Tag). Bereits am 4.Tag setzt eine verstärkte Reifung mit statistisch signifikanter Vermehrung

der Stab- und Segmentkernigen ein.
Die mittleren weißen Mitose - Indices liegen bei CML - Serumzugabe ohne statistisch signifikante Unterschiede über denen der Kontrolle und zeigen eine ansteigende Tendenz bis zum 7.Tag (Abb.19, Tab.7-10).
Die mittleren G/E-Indices bei CML-Serumzugabe steigen extrem an mit einem Gipfel über 50 am 9.Tag (Abb.20, Tab.11).

5.3. Erwähnenswert erscheint das vermehrte Auftreten von Myeloblasten - Mitose unter Eigen-Serumzusatz gegenüber der AB-Plasma-Kontroll- und der CML-Serumzusatzkultur (Tab. 12,13).

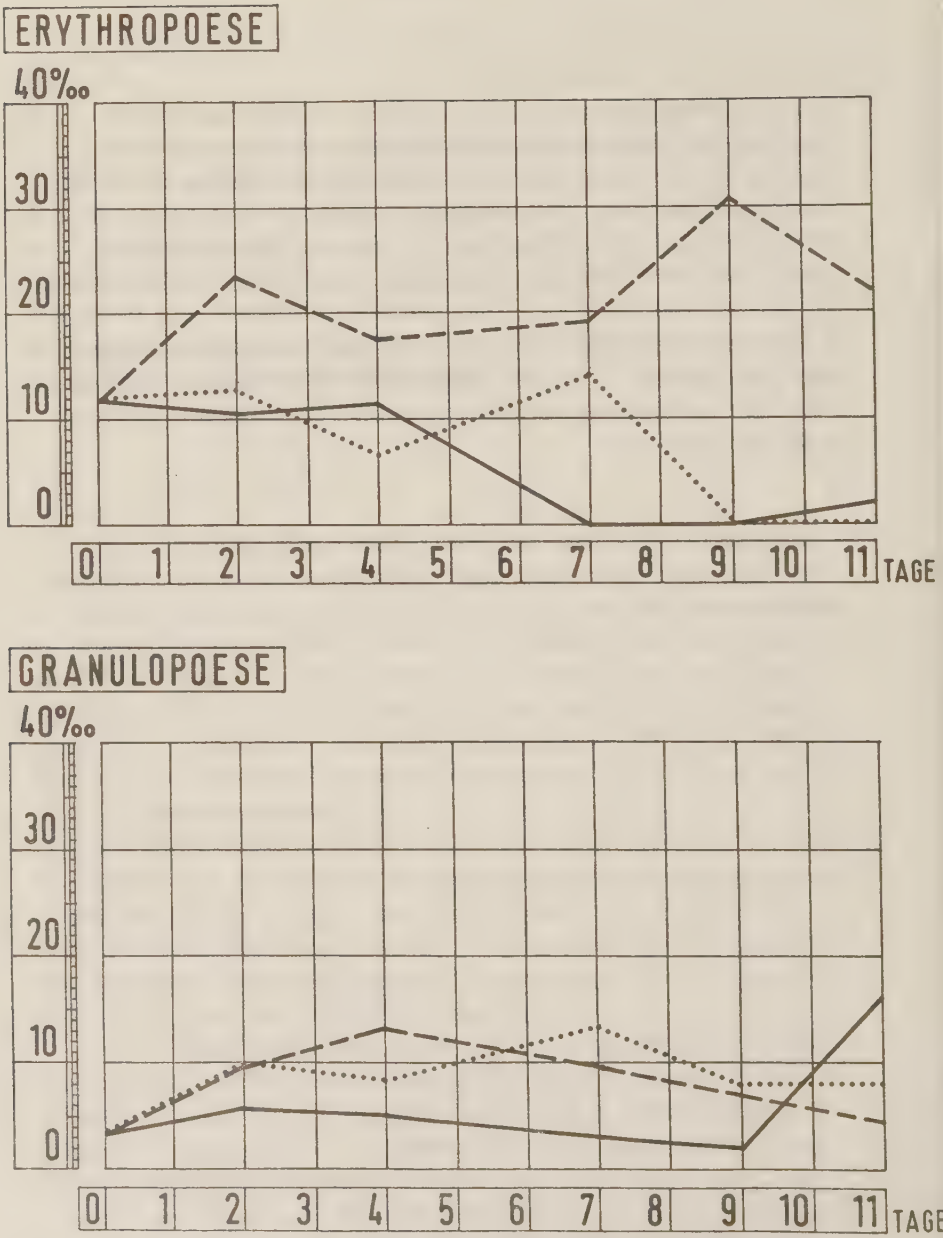


Abb. 19 MITTLERE MITOSE-INDICES
VERSUCH 1-4

	0	2	4	7	9	11d
ERYTHROPOESE						
Versuch 1	21/1166 18‰	5/ 640 7‰	1/ 98 10‰	-/ 48	-/ 24	2/ 942 2,1‰
Versuch 2	10/ 986 10,1‰	1/ 64 15,6‰	-/ 22	-/ 2	-/ 2	-
Versuch 3	7/695 10,0‰	3/ 98 30,6‰	1/ 35 28,5‰	-/ 55	-/ 20	-/ 20
Versuch 4	3/ 629 4,7‰	1/ 119 8,4‰	-/ 18	-/ 9	-/ 20	-/ 7
Mittelwert	41/3476 11,8‰	10/ 921 10,8‰	2/ 173 11,5‰	0/114	0/ 66	2/ 969 2,0‰
GRANULOPOESE						
Versuch 1	2/ 386 5,1‰	3/ 435 6,8‰	1/ 110 9,0‰	1/ 151 6,6‰	-/ 108	6/ 93 (64,5‰)
Versuch 2	2/ 431 4,6‰	2/ 527 3,7‰	-/ 215	-/ 21	-/32	-/ 2
Versuch 3	1/ 406 2,4‰	1/ 585 1,7‰	2/ 560 3,5‰	1/ 278 3,5‰	-/ 120	-/ 38
Versuch 4	1/ 589 1,6‰	6/559 10,7‰	4/ 405 9,8‰	-/215	1/ 230 4,3‰	-/228
Mittelwert	6/1812 3,3‰	12/2106 5,7‰	7/1298 5,3‰	2/ 644 3,1‰	1/ 490 2,0‰	6/ 361 16,6‰

Tabelle 7 : Mitose-Indices - AB-Plasma (Mitosen/teilungsfähige Zellen)

	0	2	4	7	9	11
ERYTHROPOESE						
Versuch 1	21/1166 18,0‰	16/ 718 22,2‰	8/ 340 23,5‰	3/ 121 24,7‰	3/ 220 13,6‰	-/ 26
Versuch 2	10/ 986 10,1‰	20/ 751 26,6‰	3/ 46 65,2‰	1/ 99 10,1‰	9/ 282 31,9‰	9/ 359 25,0‰
Versuch 3	7/ 695 10,0‰	13/ 589 22,0‰	1/ 297 3,3‰	1/ 42 23,8‰	11/ 251 43,8‰	-/ 32
Versuch 4	3/ 629 4,7‰	-	-	-	-	-
Mittelwert	41/3476 11,8‰	49/2058 23,8‰	12/ 683 17,5‰	5/ 262 19,0‰	23/ 753 30,5‰	9/ 417 21,5‰
GRANULOPOESE						
Versuch 1	2/ 386 5,1‰	8/ 481 16,6‰	5/ 547 9,1‰	3/ 207 14,4‰	1/ 114 8,7‰	1/ 40 25,0‰
Versuch 2	2/ 431 4,6‰	4/ 522 7,6‰	10/ 391 25,5‰	4/ 375 10,6‰	2/ 380 5,2‰	1/ 265 3,7‰
Versuch 3	1/ 406 2,4‰	4/634 6,3‰	4/ 509 7,8‰	-/ 121	2/ 207 9,6‰	-/ 105
Versuch 4	1/ 589 1,6‰	-	-	-	-	-
Mittelwert	6/1812 3,3‰	16/1637 9,7‰	19/1447 13,1‰	7/ 703 9,9‰	5/ 701 7,1‰	2/ 410 4,8‰

Tabelle 8 : Mitose - Indices - Eigen-Serum (Mitosen/teilungsfähige Zellen)

	0	2	4	7	9	11d
ERYTHROPOESE						
Versuch 1	21/1166 18,0‰	-/ 74	-/ 16	-/ 16	-/ 14	-/ 5
Versuch 2	10/ 986 10,0‰	-/ 26	-/ 20	-/ 28	-/ 18	-/ 5
Versuch 3	7/ 695 10,0‰	6/ 286 20,9‰	1/ 99 10,1‰	1/ 19 (52,6‰)	-/ 22	-/ 17
Versuch 4	3/ 629 4,7‰	1/ 164 6,0‰	-/ 9	-/ 8	-/ 6	-/ 18
Mittelwert	41/3476 11,8‰	7/ 550 12,7‰	1/ 144 6,9‰	1/ 71 (14,0‰)	0/ 60	0/ 45
GRANULOPOESE						
Versuch 1	2/ 386 5,1‰	8/ 656 12,1‰	6/ 536 11,1‰	7/ 491 14,2‰	4/ 423 9,4‰	5/ 191 26,1‰
Versuch 2	2/ 431 4,6‰	10/1357 7,3‰	5/ 770 6,4‰	9/ 642 14,0‰	3/ 455 6,5‰	-/ 140
Versuch 3	1/ 406 2,4‰	6/ 625 9,6‰	2/ 598 3,3‰	2/ 129 15,5‰	-/ 72	-/ 11
Versuch 4	1/ 589 1,6‰	11/ 841 13,0‰	8/ 652 12,2‰	5/ 505 9,9‰	4/ 495 8,0‰	2/552 3,6‰
Mittelwert	6/1812 3,3‰	35/3479 10,0‰	21/2556 8,2‰	23/1767 13,0‰	11/1 7,6‰	7/ 894 7,8‰

Tabelle 9 : Mitose - Indices - CML-Serum (Mitosen/teilungsfähige Zellen)

Tabelle 10 : Signifikanzbestimmung der mittleren Mitose -Indices (Versuche 1-4)

		Eigen - Serum/ AB - Plasma		CML -Serum/ AB - Plasma	
		rMI	wMI	rMI	wMI
2.d	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Sig.	ø	ø	ø	ø
4.d	p	>0,05	0,05>p>0,01	>0,05	>0,05
	Sig.	ø	(ø)	ø	ø
7.d	p	-	>0,05	-	0,05>p>0,01
	Sig.		ø		(ø)
9.d	p	-	-	-	>0,05
	Sig.				ø
11.d	p	<0,001	0,01>p>0,001	-	>0,05
	Sig.	+	(-)		ø
2.-9.d	p	<0,001	0,05>p>0,01	>0,05	0,05>p>0,01
	Sig.	+	(ø)	ø	(ø)
2.-11.d	p	<0,001	>0,05	>0,05	0,05>p>0,01
	Sig.	+	ø	ø	(ø)

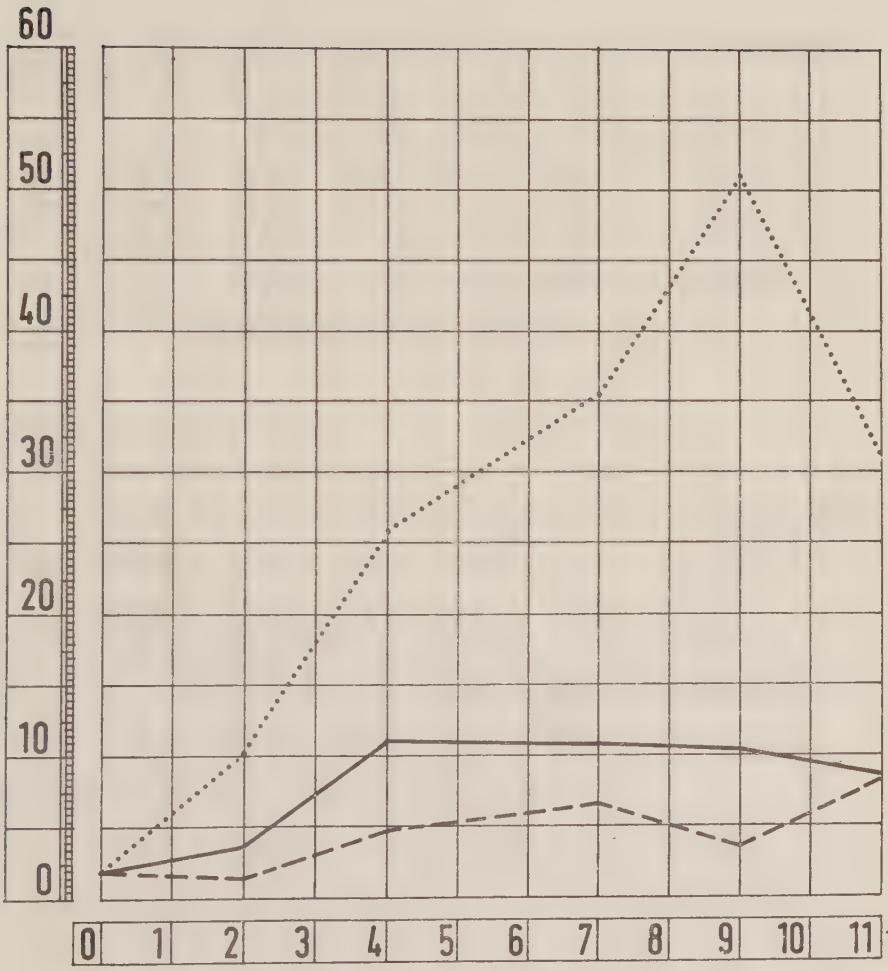


Abb. 20 MITTLERE G/E-INDICES
VERSUCH 1-4

Tabelle 11 : G/E-Indices

	0	2	4	7	9	11d
AB-Plasma						
Versuch 1	0,66	1,52	2,03	3,00	6,45	0,25
Versuch 2	0,62	3,34	20,44	-	-	-
Versuch 3	1,44	3,99	6,08	1,91	1,20	1,70
Versuch 4	1,56	5,33	15,32	27,44	22,69	23,71
Mittelwert	1,07	3,55	10,97	10,78	10,11	8,55
Eigen-Serum						
Versuch 1	0,66	1,09	2,17	2,54	2,82	9,48
Versuch 2	0,62	1,00	8,77	13,57	5,18	(3,79)
Versuch 3	1,44	1,59	3,20	3,90	3,00	10,5
Versuch 4	1,56	-	-	-	-	-
Mittelwert	1,07	1,22	4,71	6,67	3,66	7,92
CML-Serum						
Versuch 1	0,66	18,45	45,78	91,10	98,81	-
Versuch 2	0,62	12,96	19,84	24,74	(52,17)	(69,50)
Versuch 3	1,44	3,64	6,99	(0,12)	(5,46)	(3,48)
Versuch 4	1,56	5,22	29,98	24,64	49,67	20,80

Tabelle 12 : Myeloblasten/ -mitosen

	0	2	4	7	9	11d
AB-Plasma						
Versuch 1	23/-	16/-	38/-	3/-	2/-	7/2
Versuch 2	6/-	3/-	1/-	-	-	-
Versuch 3	15/-	24/-	6/-	5/-	17/-	-
Versuch 4	11/-	4/-	4/-	3/-	4/-	10/-
Mittelwert	55/-	47/-	49/-	11/-	23/-	17/2
Eigen-Serum						
Versuch 1	23/-	10/2	15/-	13/-	11/-	2/-
Versuch 2	6/-	13/-	3/1	2/-	6/-	2/-
Versuch 3	15/-	15/-	19/-	3/-	7/1	1/-
Versuch 4	11/-	-	-	-	-	-
Mittelwert	55/-	38/2	37/1	18/-	24/1	5/-
CML Serum						
Versuch 1	23/-	18/1	14/-	39/-	11/-	5/-
Versuch 2	6/-	10/-	2/-	6/-	6/-	-
Versuch 3	15/-	10/-	1/-	2/-	-	-
Versuch 4	11/-	27/1	10/-	7/-	7/-	2/-
Mittelwert	55/-	65/2	27/-	54/-	24/-	7/-

Tabelle 13 : Gesamt-Myeloblasten-Mitose-Index (2.-11.Tag)

AB-Plasma: 13,6% (147/2)
Eigen-Serum: 32,7% (122/4)
CML-Serum: 11,2% (177/2)

Anhand der durchgeführten Versuche ist es möglich, quantitative Aussagen über die zellulären Aktivitäten der Erythro- und Granulopoese von Patienten mit Anämien bei Zugabe von Eigen- und CML-Serum während 11 tägiger Inkubation in der Flüssigkeitkultur zu machen.
Da sich, wie BOLL et al. (13) an Koagulumkulturen mit verschiedenen Zusätzen zeigten, die meisten regulativen Veränderungen des erythropoetischen Proliferations- und Reifungsspeichers im Knochenmark auf die vorhandene Erythropoetin-Konzentration zurückführen lassen, muß auch hier der erhöhte Erythropoetinspiegel im Eigen-Serum der anämischen Patienten für die Stimulation verantwortlich gemacht werden. Ähnliche Zusammenhänge wurden auch von anderen Autoren beschrieben (66,52). Beim Erythropoetingehalt im Serum anämischer Patienten muß allerdings von unterschiedlich hohen Werten abhängig von der Form und der Schwere der Anämie ausgegangen werden. Der Erythropoetinspiegel weist eine gewisse Korrelation mit der Hb-Konzentration und dem Hkt im menschlichen Plasma auf. Dies trifft für die verschiedenen Anämieformen nicht in gleicher Weise zu. HAMMOND et al. (30,31) fanden ansteigende Titer bei zunehmender Schwere der Anämie. Dabei zeigten die Patienten mit hypoplastischer Anämie gegenüber solchen mit hämolytischer Anämie höhere Werte bei vergleichbaren Hb-Konzentrationen. Ähnliches bestätigen auch ESSERS und MANN (23) beim Vergleich aplastischer Anämie mit chronischer Fe-Mangel- oder chronisch-hämolytischer Anämie. Im Gegensatz dazu stellte ALEXANIAN (2) keine Unterschiede zwischen hypoplastischer und hämolytischer Anämie bei Messung der Erythropoetinaktivität seiner Patienten fest. ADAMSON (1) untersuchte die Erythropoetin-Ausscheidung bei Patienten mit blutungsinduzierter Anämie und stellte erhöhte Werte mit fallendem Hkt fest. WARD et al. (73) gehen von einer Steigerung des Erythropoetinspiegels mit zunehmender Anämie aus, wobei die Korrelation mit dem Hkt bei milden Formen weniger stark ausgeprägt ist. VAN DYKE et al. (71) berich-

teten, daß sich eine signifikant erhöhte Erythropoetin-Aktivität in Serum und Urin von Patienten mit Fe-Mangel-Anämie nur bei stark ausgeprägter Anämie findet. Die Untersuchungen von PAVLOVIC-KENTERA et al. (54) ergaben erhöhte Erythropoetinspiegel bei allen Patienten mit aplastischer Anämie, wobei keine Korrelation zum Hb-Wert bestand. Verglichen wurde mit den Werten von Patienten mit sideropenischer Anämie gleichen Schweregrades. KURNICK (45) fand in seinen Versuchen, daß Vitamin B_{12}-Mangel bei perniziöser Anämie den Erythropoetinspiegel erhöhte. Die differierenden Ergebnisse sind z.T. in der unterschiedlichen Sensitivität der verwendeten Methoden begründet.

In allen in dieser Arbeit vorliegenden Versuchen hatte frisches Eigen-Serum eine Stimulation der erythropoetischen Zellen bewirkt, was wir auf den Erythropoetineffekt zurückführen. Bis zum 4.Tag sind die Zellen des Proliferationskompartiments, die PE, bE und pE, vermehrt gegenüber der Kontrollkultur mit AB-Plasma, in Verbindung mit einer Erhöhung des roten Mitose-Index (Abb.19). An der Vermehrung der oxyphilen Erythroblasten, wie im Falle der perniziösen Anämie (V3),oder der reifen Erythroblasten bei sideroblastischer Anämie (V1) zeigt sich eine gesteigerte Ausreifung ab 7.Kultivierungstag mit Eigen-Serum. Auch die in Versuch 2 mit Fe-Mangel-Anämie ermöglichte längere Lebensdauer der Kultur unter Eigen-Serumzugabe im Vergleich zur Kontrolle kann als Stimulation gewertet werden. Daraus ergibt sich, daß die Erythroblasten des anämisch veränderten Knochenmarks durch frisches Eigen-Serum in vitro stimulierbar sind, was sowohl die Regeneration wie auch die Reifung betrifft. Ein in der Fe-Mangel-Anämie-Kultur (V2) und in der Kultur mit perniziöser Anämie (V3), geringer auch bei der sideroblastischen Anämie (V1) am 7.-9. Tag beobachtete erneute Regenerationsschub, führt u.a. zu einer Vermehrung der Proerythroblasten und besonders der basophilen Erythroblasten.Es ist denkbar, daß Vorläuferzellen der Erythropoese, ähnlich wie BFU_e und CFU_e, in diesen Kulturen stimuliert werden, da sie nach SAMARUT et al.,

ISCOVE & GUILBERT und WAGEMAKER (62,41,68) fünf bis acht Tage zur Umwandlung in Erythroblasten benötigen. Weiterhin ist denkbar, daß der 2.Wachstumsschub der Erythroblasten durch die mit der Zeit zunehmende Sauerstoff-Armut in der Gasphase des Kulturmediums bedingt ist. RICH & KUBANEK (59) stellten in Agarkulturen von BFU_e und CFU_e eine gesteigerte Koloniebildung bei reduziertem O_2-Gehalt im Vergleich zum Wachstum bei atmosphärischem O_2-Partialdruck fest.

BOLL und KOENIGS (10) konnten nach Colchizin-Blockierung der Mitosen an sideroblastischem Knochenmark in Plasma-Clot-Kulturen zeigen, daß die Regeneration vermehrt, und die Ausreifung der Erythroblasten trotz der Fe-Verwertungsstörung nicht beeinträchtigt ist. Es zeigte sich keine Kernreifungsstörung, wogegen HUBER et al. (38) bei autoradiographisch - zytophometrischen Untersuchungen eine Häufung von Zellen in der G_2 Phase fanden, die sie als Proliferationsarrest deuteten. Der in Versuch 1 mit sideroblastischer Anämie unter Eigen-Serumzugabe während der gesamten Kulturdauer erhöhte rote Mitose-Index und die Vermehrung der Zellen des Proliferationskompartiments sprechen für eine Regenerationsförderung. Zusammen mit der Vermehrung der reifen Erythroblasten am 11.Tag - also einer Reifungsförderung - liegt auch bei dieser Anämieform eine Proliferationssteigerung der Erythropoese unter Eigen-Serum vor.

Von BOLL und MERSCH (8) wurden in Knochenmarksuntersuchungen an Patienten mit Blutungs- und Fe-Mangel-Anämie ein vermehrtes Teilnehmen der pE und oE an der Regeneration beschrieben. Durch Gabe von Eisen in der 2 wertigen Form in einer Dosis, die der totalen Eisenbindungkapazität des Plasmas entspricht oder in Verbindung mit Transferrin durch Zugabe von Serum mit erhöhtem Eisengehalt, wurde eine stimulierende Wirkung auf die Reifung des erythropoetischen Proliferationsspeichers bei Fe-Mangel-Anämie von BOLL et al. (13) erzielt. Es kam zu einer Zunahme der reifen Erythroblasten, der Retikulozyten sowie der Sideroblasten und Siderozyten. Demnach erscheint die Reifung der Erythroblasten in vitro abhängig von dem Eisenangebot des als Medium ver-

wendeten Blutplasmas. Dies stützt sich u.a. auf Untersuchungen an 3-Tage-Koagulumkulturen, wohingegen wir einen Zeitraum von 11 Tagen beobachten. Am 7.-9.Tag kommt es in der Eigen-Serumzusatzkultur bei Fe-Mangel-Anämie (V2) zu einem zweiten Wachstumsschub mit relativer Vermehrung der PE, bE, pE und oE gegenüber dem Ausgangswert. Es finden sich am 9.Tag Mitosen der bE,pE und oE. Das vermehrte Auftreten von pE und oE am 7. und 9.Tag (V2) in der Eigen-Serumzusatzkultur läßt sich auch so interpretieren, daß es unter Eigen-Serum zu einer Stimulation Hb-synthetisierender Zellen und infolge erschöpfter Eisendepots zu einem Auftreten Hb-armer und deswegen noch teilungsfähiger oxyphiler Erythroblasten kommt. Zudem scheint die relative O_2-Armut in vitro eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Erythroblasten wie auf die BFU_e in der Agarkultur auszuüben (59).

Die in Versuch 3 mit megaloblastischem Knochenmark gefundene Regenerations- und Ausreifungstendenz,verstärkt durch Eigen-Serum, stimmt überein mit den Befunden von BOLL et al. (8,10). Bemerkenswert ist, daß das Megaloblastenmark bei perniziöser Anämie in vitro genauso wie normales Erythroblastenmark ausreift (13). Auch ohne Cobalamin-Zusatz kam es zu einer Normalisierung der Megaloblasten, so daß im vorliegenden Versuch (V3) ab 7.Tag der Anteil der Megaloblasten nur noch sehr gering war.

Mit dem hier verwendeten Versuchsansatz läßt sich außerdem ein stimulierender Einfluß von Eigen-Serum auf die Granulopoese feststellen. In unterschiedlicher Weise sind in den ausgewerteten Versuchen sowohl teilungsfähige Granuloblasten wie auch nichtteilungsfähige Granulozyten in der Eigen-Serum-Kultur gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant vermehrt. Der mittlere weiße Mitose-Index liegt während der gesamten Kulturdauer über dem Kontrollwert mit AB-Plasma. Demnach müssen auf die Granulopoese stimulierend wirkende Faktoren im Serum der anämischen Patienten vorhanden sein (13,24,48,56,69), die schon von BOLL et al. (13) über 3 Tage und hier länger bis zu 11 Tagen nachgewiesen werden konnten.

Aus Untersuchungen an Clot-Kulturen ist bekannt, daß Seren von Patienten mit CML einen stark stimulierenden Einfluß auf die normale menschliche Granulopoese haben (14). Der Mitose-Index wird erhöht und es kommt zu einer Zunahme von teilungsfähigen Granuloblasten in der 3-Tage-Kultur, was als Regenerationsförderung zu werten ist. Eine Stimulation der Differenzierung normaler granulopoetischer Zellen wurde bei einer Konzentration von 40% CML-Serum im Kulturmedium nicht ermittelt. Dies läßt sich mit den hier gefundenen Ergebnissen vergleichen: In allen 4 untersuchten anämischen Knochenmarkproben wurde zuerst eine signifikante Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten unter CML-Serumzusatz gegenüber der Kontrolle mit AB-Plasma beobachtet. Vom 4.Tag an kam es zu einer signifikanten Vermehrung von stab- und segmentkernigen Granulozyten unter dem Einfluß von CML-Serum im Vergleich zur Kontrolle. Auch in Versuch 4, in dem die Zellen in 40% CML-Serum inkubiert wurden, fand eine signifikante Vermehrung sowohl der teilungsfähigen wie der nichtteilungsfähigen granulopoetischen Zellen gegenüber der AB-Plasma-Kultur statt. Aus dem weißen Mitose-Index (Abb.18) kann weiterhin eine Förderung der Regeneration und der Reifung granulopoetischer Zellen von anämisch verändertem Knochenmark in vitro durch CML-Serum konstatiert werden. Die Wirkung von CML-Serum in der Suspensionskultur scheint der von CSA (colony stimulating activity) in der Agar-Kolonie-Technik zu entsprechen, bei der durch CSA das Wachstum granulopoetischer Zellen gefördert wird (63,27). Dies schlägt sich auch in der Erhöhung der G/E-Indices unter CML-Serum-Einfluß nieder (Abb.20).

Bemerkenswert ist auch, daß die PE bzw. bE in allen Versuchen durch CML-Serum relativ vermehrt wurden, trotz relativer Verminderung der Erythroblasten, ersichtlich am G/E-Index und am roten Mitose-Index. Dies legt die Vermutung nahe, daß bei Zugabe von gefrorenem CML-Serum Substanzen ähnlich der BPA (Burst Promoting Activity) in der Agarkultur-Technik wirksam werden, wenngleich nicht so stark wie frisches Eigen-Serum.

Auffällig ist das Auftreten von Myeloblasten-Mitosen unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich der Gesamt-Myeloblasten-Mitose-Index (Tab.13) bei Anämie-Serumzusatz auf fast das 3 fache gegenüber der AB-Plasmakultur und der CML-Serumkultur erhöht. Dies ergibt sich, obgleich hier nur drei Versuche gegen sonst vier zusammen gefaßt sind und die hämolytische Anämie (Versuch 4) mit dem erwartungsgemäß höchsten Anteil fehlt. Die Myeloblasten sind eine sich selbst erhaltende und zur Differenzierung fähige Zellgruppe, die sich zusammen mit der kurzen Zellverdopplungszeit unter normalen Bedingungen als frühe Zelle der granulopoetischen Reihe ausweist (9). Bei akuter wie bei der chronisch myeloischen Leukämie liegt der Mitose-Index der Myeloblasten unter dem der normalen Granulopoese. In Versuchen mit Koagulum -Kulturen von hämolytischen Anämien fand BOLL (11,15) einen stark gesteigerten Myeloblasten-Mitose-Index (bis 100 ‰). Als Erklärung kommt in Betracht, daß die Zellen, die morphologisch dem Myeloblasten-Kompartiment zugeordnet werden, funktionell früher einzureihen sind, und noch keine feste granulopoetische Determination besitzen. Bei Stimulation der Erythropoese im anämischen Knochenmark oder in vitro durch Eigen-Serumzusatz kommt es zu vermehrter Zellverdopplung, vermutlich mit anschließender Differenzierung in die erythropoetische Reihe. Es gibt Hinweise, daß die Myeloblasten den morphologisch nicht gekennzeichneten BFU_e entsprechen (42).

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von autologem und CML-Serum auf die Proliferation der Erythropoese und Granulopoese in vitro im Knochenmark bei verschiedenen Anämien.

Es wurde Knochenmark von 4 Patienten mit sideroachrestischer, Fe-Mangel-, perniziöser und hämolytischer Anämie gewonnen und jeweils eine Kontrollkultur mit gefrorenem AB-Plasma, eine Zusatzkultur mit 100 % frischem Eigen-Serum sowie eine Zusatzkultur mit 40 % oder 100 % gefrorenem und getautem CML-Serum angelegt. Aufgrund der Zelldifferenzierung wurden Reifungskurven erstellt und der G/E-Index sowie der rote und weiße Mitose-Index berechnet. Weiterhin wurde der Gesamt-Myeloblasten-Mitose-Index bestimmt.

Frisches Eigen-Serum als Erythropoetin-Spender hat in allen Fällen eine stimulierende Wirkung auf die anämische Erythropoese über 10 Tage. Dies gilt mit einem 2.Wachstumsgipfel am 7.-9.Tag sowohl für die Regeneration, wie für die Reifung. Darüber hinaus zeigte sich eine Stimulation der Granulopoese mit Vermehrung der Granuloblasten und Granulozyten und einer Erhöhung der weißen Mitose-Indices, obwohl ein Absinken des G/E-Index zu verzeichnen ist.

Gefrorenes CML-Serum als CSA-Spender bewirkt eine statitisch signifikante Vermehrung der granulopoetischen Zellen gegenüber der Kontrollkultur, sichtbar an der starken Zunahme des G/E-Index. Es sind sowohl die Regeneration (die mittleren weißen Mitose-Indices sind bis zum 9.Tag erhöht) wie die Reifung der Granulopoese gefördert. In 2 Versuchen (perniziöse und hämolytische Anämie) fand sich auch eine leichte Stimulation der Erythropoese in der CML-Serumzusatzkultur.

Der Gesamt- Myeloblasten-Mitose-Index ist bei Eigen-Serumzusatz deutlich höher als in der AB-Plasma-Kontroll- und in der CML-Serum-Kultur, was als Hinweis darauf gedeutet werden kann, daß der Myeloblast bei Bedarf die Funktion von BFU_g erfüllt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adamson, J.W. : The erythropoietin/ hematocrit relationship in normal and polycythemic man: Implication of marrow regulation.
Blood 32, 597 (1968)

2. Alexanian, R. : Erythropoietin excretion in bone marrow failure and hemolytic anemia.
J.Lab.Clin.Med. 82, 438 (1973)

3. Aye, M.T. : Erythroid colony formation in cultures of human marrow: effect of leukocyte conditioned medium.
J.Cell.Physiol. 91, 69 (1977)

4. Begemann,H., J. Rastetter : Atlas der klinischen Hämatologie. 3.Auflage, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1978)

5. Belitz, H.J. : Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Sonderdruck aus: Der Mathematikunterricht. Heft 3/60.
Ernst Klett Verlag, Stuttgart (1960)

6. Boll, I. : Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966)

7. Boll, I. : Die Proliferationskinetik der normalen und angeregten Erythropoese nach morphologischen Kriterien. 13.Tagg. Dtsch. Ges. Haemat. Ulm 1968, S.49

8. Boll, I., G. Mersch : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17, 193 (1968)

9. Boll, I., G. Mersch : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro.
Blut 19, 257 (1969)

10. Boll, I., H.P. Koenigs : The kinetics of the normal, the megaloblastic and the sideroachrestic erythropoiesis estimated by colchicine blocking in vitro.
Blood 37, 204 (1971)

11. Boll, I. : Interaction of the proliferation in the myeloblastic and the proerythroblastic compartment in the different haematological disorders.
Eortc Stem Cell Club Meeting,
Schloß Reisensburg 1972

12. Boll, I., H. Collmann : Quantitative Bestimmung der Proliferationskinetik des menschlichen Knochenmarks während 3 Kulturtagen.
Blut 31, 201 (1975)

13. Boll, I. u. Mitarbeiter : Studien zur humoralen Regulation des erythropoetischen Proliferationsspeichers beim Menschen.
Klin. Wschr. 56, 187 (1978)

14. Boll, I. and coworkers : Serum factors influencing human granulocytopoietic proliferation in clot cultures.
Exp. Hemat. 7, 121 (1979)

15. Boll, I. : Zytologische Knochenmarksdiagnostik.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1980)

16. Boll, I. : Megaloblastische Anämien.
Med. Welt 38, (1981)

17. Bortz, J.: Lehrbuch der Statistik. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1977)

18. Bradley, T.R., W.Robinson, D.Metcalf : Colony production in-vitro by normal, polycythaemic and anaemic bone marrow. Nature 214, 511 (1967)

19. Bruce, W.R., E.A.Mc Culloch : The effect of erythropoietic stimulation on the hemopoietic colony-forming-cells of mice. Blood 23, 216 (1964)

20. Dörmer, P. : Kinetics of erythropoietic cell proliferation in normal and anemic man. A new approach using quantitative ^{14}C-Autoradiography. Fischer Verlag Stuttgart 1973

21. Dörmer, P., W.Brinkmann : Kinetik der Zellproliferation bei akuter und chronischer Hämolyse. In: Hämolyse - hämolytische Erkrankungen hrsg. L. Nowicki, H.Martin, J.C.F.Schubert Lehmann, München (1973)

22. Erslev, A.J. : Erythropoietin in vitro. In: Erythropoiesis. Jacobson L.O., M.Doyle, Grune & Stratton, New York, London (1962)

23. Essers, U., H.Mann : Die Erythropoetinaktivität des Blutes bei Anämie mit hyperplastischem und hypoplastischem Knochenmark. Blut 22, 297 (1971)

24. Fakhri, O., L.Novri : Effects of macrophage transfusion on white cell production in aplastic anemia. Brit. J. Haemat. 39/4, 623 (1978)

25. Finch, C.A., A.D.Coleman, A.G.Motulsky, D.M.Donohue, R.H.Reiff : Erythrokinetics in pernicious anemia. Blood 11, 807 (1956)

26. Fliedner, T.M., B.Kubanek : Umsatzkinetik und Regulation der Erythropoese bei hämolytischen Syndromen. In: Hämolyse - hämolytische Erkrankungen hrsg. L. Nowicki, H.Martin, J.C.F.Schubert Lehmann, München (1973)

27. Goldman, J.M., K.H.Th'ng, R.M.Lowenthal : In vitro colony-forming cells and colony stimulating factor in chronic granulocytic leukemia. Brit.J.Cancer 30 (1974)

28. Gregory, C.J. : Erythropoietin sensivity as a differentiation marker in the haemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. J.Cell.Physiol. 89, 289 (1976)

29. Gurney, C.W., L.G.Lajtha, R.Oliver : A method for investigation of stem cell kinetics. Brit.J.Haemat, 8, 461 (1962)

30. Hammond, G.D., A.Ishikavo, G.Keighley : Regulationship between erythropoietin and severity of anemia in hypoplasic and hemolytic states. In: Erythropoiesis. Jacobson, L.O., M.Doyle Grune & Stratton, New York, London (1962)

31. Hammond, G.D., N.Shore, N.Movassaghi : Production, utilization and excretion of erythropoietin: 1.Chronic anemias, 2.Aplastic crisis, 3. Erythropoietic effect of normal plasma. Ann.N.Y.Acad.Sci. 149, 516 (1968)

32. Hanna, J.R.A., R.G.Tarbutt, L.F.Lamerton : Shortening of the cell-cycle time of erythroid precursors in response to anemia. Brit.J.Haemat. 16, 381 (1969)

33. Heckner, F. : Praktikum der mikroskopischem Hämatologie. 5.Auflage, Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore (1981)

34. Hershko, Ch., A.Karsai, L.Eylon, G.Izak : The effect of chronic iron deficiency on some biochemical functions of human hemopoietic tissue. Blood 36, 321 (1970)

35. Hillman, R.S., P.A.Henderson : Control of marrow production by the level of iron supply. J.Clin.Invest. 48,454 (1969)

36. Hinterberger, W. : Untersuchungen über Granulopenie bei Patienten mit perniziöser Anämie. Acta.Med.Austr. 8/2, 34 (1981)

37. Hodgson, G., J.Eskuche : Dose response relationship for the "early" and "late" response te erythropoietin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 127, 1094 (1968)

38. Huber, C., H.Huber, A.Stacher, H.Braunsteiner : Autoradiographic and cytophotometric studies on hematopoiesis in primarily retrastory and siderochrestic anemia. Blut 24, 142 (1972)

39. Iscove, N.N., F.Sieber, K.H.Winterhalter : Erythroid colony forming in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin. J.Cell.Physiol. 83. 309 (1974)

40. Iscove, N.N. : Comparison of human and mouse erythroid progenitor detected by colony formation in culture. In: Erythropoiesis. Nakao, K., J.W.Fisher, F.Takaku, University of Tokyo Press, Tokio (1975)

41. Iscove, N.N., L.J.Guilbert : Erythropoietin-Independence of early erythropoiesis and a two-regulator-model of proliferative control in hemopoietic system. In: In Vitro Aspects of Erythropoiesis. Murphy,M.J. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978)

42. Kelemen, E., W.Calvo, T.M.Fliedner : Atlas of human haemopoietic development. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1979)

43. Krantz, S.B., O.Gallien-Lartigue, E.Goldwasser : The effect of erythropoietin upon heme synthesis by marrow cells in vitro. J.Biol.Chem.238, 4085 (1963)

44. Kubanek, B., S.Tyler, L.Ferrari, A.Porcellini, D.Howard, F.Stohlman : Regulation of Erythropoiesis XXI. The effect of erythropoietin on the stem cell. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 127 (1968)

45. Kurnick, N.B. : Role of erythropoietin in pernicious anemia. Clin.Res. 8, 129 (1960)

46. Lajtha, L.G., R.Oliver : Studies on the kinetics of erythropoiesis: A Model of the erythron. In: Ciba Foundation Symposion on Haemopoiesis, ed. by G.E.Wolstenholme, M.O'Connor Churchill, London 1960 , p.289

47. Lajtha, L.G. : Haemopoietic stem cells. Brit.J.Haemat. 29, 529 (1975)

48. Mahmood, T., W.A.Robinson, J.E.Kurnick, R.Vautrin : Granulopoietic and erythropoietic activity in patients with anemias of iron deficiency and chronic disease. Blood 50 (1977)

49. Mc Donald, G.A., T.C.Dodds, B.Cruickshank : Atlas der Haematologie. 3.Auflage, Thieme, Stuttgart (1979)

50. Morse, B.S., N.J.Rencricca, F.Stohlman : Relationship of erythropoietin effectivness to the generative cycle of erythroid precursor cells. Blood 35, 761 (1970)

51. Müller, D. : Haemoglobin-, RNS- und DNS-Synthese in den Erythroblasten bei hämolytischer Anämie. In: Hämolyse - hämolytische Erkrankungen, hrsg. L.Nowicki, H.Martin, J.C.F.Schubert Lehmann, München (1973)

52. Necheles, T.F., R.G.Sheehan, H.J.Meyer : Studies on the control of hemoglobinsynthesis: Nucleic acid synthesis and normoblast proliferation in the presence of erythropoietin. Ann.N.Y.Acad.Sci. 149, 449 (1968)

53. Papayannopoulou, T., C.A.Finch : On the in vivo action of erythropoietin: A quantitative analysis. J.clin.Invest. 51, 1179 (1972)

54. Pavlovic - Kentera, V., P.Milenkovic, V.Jovanovic, L.Biljanovic-Paunovic : Erythropoietin in aplastic anemia. Blut 39, 345 (1979)

55. Powsner, E.R., L.Berman : The effect of erythropoietin on erythroblast maturation in bone marrow cultures. In: Erythropoiesis. Jacobson, L.O., M.Doyle Grune & Stratton, New York (1962)

56. Powsner, E.R., L.Berman : Effect of erythropoietin on DNA synthesis by erythroblasts in vitro. Blood 30, 189 (1967)

57. Reissmann, K.R., Samorapoompichit : Effect of erythropoietin on proliferation of erythroid stem cells in the absence of transplantable colony-forming units. Blood 36,287 (1970)

58. Rencricca, N.J., V.Rizzoli, D.Howard, P.Duffy, F.Stohlman : Stem cell migration and proliferation during severe anemia. Blood 36, 764 (1970)

59. Rich, I.N., B.Kubanek : The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. Brit.J.Haemat. 52, 579 (1982)

60. Rickard, K.A., N.J.Rencricca, R.K.Shadduck, F.C.Monette, D.Howard, M.Garrity, F.Stohlman : Myeloid stem cell kinetics during erythropoietic stress. Brit.J.Haemat. 20, 537 (1971)

61. Rondanelli, E.G., P.Gorini, E.Maglinlo, P.C.Fiori : Differences in proliferative activity between normoblasts and pernicious anemia megaloblasts. Blood 24, 542 (1964)

62. Samarut, I., M.Bonabdelli : In vitro development of CFU-E and BFU-E in cultures of embryonic and postembryonic chicken hematopoietic cells. J.Cell.Physiol. 105, 553 (1980)

63. Schooley, J.C., J.F.Garcia, L.N.Cantor, V.W.Havens : A summary of some studies on erythropoiesis using anti-erythropoietin immune serum. Ann.N.Y.Acad.Sci. 149, 266 (1968)

64. Silver, R.K., A.J.Erslev : The action of erythropoietin on erythroid cells in vitro. Scand.J.Haemat. 13, 338 (1974)

65. Stohlman, F., G.Brecher, R.R.Moores : Humoral regulation of erythropoiesis. VIII: The kinetics of red cell production and the effect of erythropoietin. In: Erythropoiesis. Jacobson,L.O., M.Doyle, Grune & Stratton, New York-London (1962)

66. Stohlman, F., S.Ebbe, B.Morse, D.Howard, J.Donovan : Regulation of erythropoiesis. XX. Kinetics of red cell production.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 149, 156 (1968)

67. Stohlman, F., P.J.Quesenberry, W.S.Tyler : The regulation of myelopoiesis as approached with in vivo and in vitro techniques.
Progr. Hemat. 8, 259 (1973)

68. Testa, N.G., Dexter, T.M. : Production of erythroid precur or cells (BFU) in vitro.
In: In Vitro Aspects of Erythropoiesis. Murphy,M.J. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978)

69. Toksöz, D., T.M.Dexter, B.I.Lord, E.G.Wright, L.G.Lajtha: The regulation of hemopoiesis in long-term-bone-marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation.
Blood 55, 931 (1980)

70. Undritz, E. : Haematologische Tafeln. Sandoz AG, Nürnberg, 2.Auflage (1972)

71. Van Dyke, D.C., M.Layrisse, J.H.Lawrence, J.F.Garcia, M.Pollycove : Relation between severity of anemia and erythropoietin titer in human beeings.
Blood 18, 187 (1961)

72. Wagemaker, G. : Cellular and soluble factors influencing the differentiation of primitive erythroid progenitor cells (BFU-e) in vitro.
In: In Vitro Aspects of Erythropoiesis. Murphy,M.J. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978)

73. Ward, H.P., J.E.Kurnick, M.J.Pisarczyk : Serum level of erythropoietin in anemias associated with chronic infection, malignancy and primary hematopoietic disease.
J.Clin.Invest. 50, 332 (1971)

74. Wickramasinghe, S.N., E.H.Cooper, D.G.Chalmers :
A study of erythropoiesis by combined morphologic, quantitative cytochemical and autoradiographic methods. Normal human bone marrow, Vit. B_{12} deficiency and iron deficiency anemia.
Blood 31, 304 (1968)

Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die stets hilfreiche Betreuung dieser Arbeit.

Ebenfalls sei an dieser Stelle den Mitarbeitern von Frau Professor Dr. med. Irene Boll für ihre Unterstützung gedankt.

LEBENSLAUF

Name: Silke Wegeleben
geboren am 5.10.1959 in Berlin, ledig

Eltern: Dietrich Wegeleben, Industriekaufmann
Christel Wegeleben, geb. Günther, Archivarin

Schule: 1966 - 1970 Grundschule in Berlin-Tiergarten
1970 - 1978 Goethe-Gymnasium
in Berlin-Wilmersdorf
Abitur am 28.6.1978

Studium: Human - Medizin
1978 - 1980 Freie Universität Berlin
1980 - 1982 Philipps-Universität Marburg
1982 - 1985 Freie Universität Berlin

Ausbildung im Praktischen Jahr:
Kinderheilkunde am Krankenhaus Berlin-Neukölln
Innere Medizin am Krankenhaus Moabit, Berlin
Chirurgie am Krankenhaus Moabit, Berlin

Ärztliche Vorprüfung - August 1980
1.Abschnitt d. ärztl. Prüfung - August 1981
2.Abschnitt d. ärztl. Prüfung - März 1984
3.Abschnitt d. ärztl. Prüfung - 15.4.1985

Approbation am 29. April 1985 in Berlin

Promoviert am 19. August 1985 in Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen